

Aus dem Institut für Tierzucht und Tierhygiene
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl für Tierzucht: Professor Dr. H. Kräußlich

**IN VITRO PRODUKTION
VON RINDERZYGOTEN**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von

Angela Lutterbach

aus

Bad Tölz

München 1987



Aus dem Institut für Tierzucht und Tierhygiene
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl für Tierzucht: Professor Dr. H. Kräußlich

IN VITRO PRODUKTION

VON RINDERZYGOTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von
Angela Lutterbach

aus
Bad Tölz

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. H. Kräußlich

Korreferent: Prof. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

Meinen Eltern
in Dankbarkeit



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554617_0059

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	
2.	Literatur	2
2.1	Physiologie der Reifung von Oozyten	2
2.1.1	Ursprung und Entwicklung der Keimzellen	2
2.1.2	Follikelwachstum	3
2.1.3	Selektion	3
2.1.4	Atresie	5
2.1.5	Der ovulierende Follikel	5
2.1.6	Biosynthetische Aktivität reifender Oozyten	7
2.1.6.1	RNA-Synthese	7
2.1.6.2	Protein-Synthese	8
2.1.6.3	Energiebedarf der reifenden Oozyten	9
2.2	In vitro Reifung von Oozyten bei verschiedenen Versuchs- und Nutztieren	9
2.2.1	Geschichte	9
2.2.2	Hormoneinfluß	10
2.2.3	Cumulus oophorus und Follikelzellen	12
2.2.4	Proteinbiosynthese	13
2.2.5	Physiologische Meiose-Hemmstoffe und c-AMP	13
2.2.6	Verschiedene Medien und Substrate	14
2.2.7	Nachkommen aus in vitro gereiften Oozyten	15
2.3	In vitro Reifung von Rinderoozyten	16
2.4	In vitro Fertilisation beim Rind	24
2.4.1	Geschichte	24
2.4.2	Grundlagenforschung	24
2.4.3	Oozyten-Reifung und in vitro Fertilisation	25
2.4.4	Normale Entwicklung nach in vitro Fertilisation beim Rind	28
2.5	Vorkerndarstellung bei lebenden Zygoten	29
2.5.1	Fluoreszenzfarbstoffe	29
2.5.2	Zentrifugation	30
2.6	Kultur von Rinderembryonen	31

3.	Material und Methode	34
3.1	Gewinnung der Oozyten	34
3.2	Oozytenreifung	35
3.3	Inkubation von Granulosazellen	35
3.4	In vitro Fertilisation (IVF)	37
3.4.1	IVF mit Frischsperma	37
3.4.2	IVF mit TGN ₂ -Sperma	37
3.5	In vitro Kultur	38
3.6	In vivo Kultur	39
3.7	Beurteilung	39
3.8	Zusammenstellung der verwendeten Medien	41
4.	Ergebnisse	44
4.1	Oozytengewinnung	44
4.2	I. Versuchsperiode	46
4.2.1	Ausschließliche in vitro Kultur	46
4.2.2	In vivo Kultur nach Fertilisation	48
4.3	II. Versuchsperiode	50
4.3.1	Oozytenreifung	50
4.3.2	In vitro Fertilisation	55
4.3.3	In vitro Kultur	58
4.3.4	In vivo Kultur	60
4.3.5	Steroidsynthese der Granulosakulturen	64
4.4	Vorkerndarstellung durch Zentrifugation	64

5.	Anwendungsmöglichkeiten	66
5.1	Steigerung der Zahl der Nachkommen weiblicher Tiere	66
5.1.1	Selektion und Zuchtwertschätzung	66
5.1.2	Erbfehlerdiagnostik	67
5.1.3	Genreserven	68
5.2	Fertilitätstests	69
5.3	Praktische Anwendung der in vitro Fertilisation	69
5.4	Kryokonservierung von weiblichen Keimzellen	71
5.5	Bereitstellung von Embryonen für die Forschung	72
6.	Diskussion	80
6.1	Oozytengewinnung	80
6.2	In vitro Reifung und in vitro Fertilisation von Rinder- oozyten	82
6.3	Kultur fertilisierter Oozyten	89
6.4	Anwendungsmöglichkeiten	92
7.	Zusammenfassung	98
	Summary	100
8.	Schlußgedanken	102
9.	Literaturverzeichnis	104
10.	Verzeichnis mehrfach verwendeter Abkürzungen	129

1. EINLEITUNG

Neue Biotechniken finden in bestimmten Bereichen der Tierzucht und der Reproduktionsphysiologie zunehmend Interesse und Anwendung.

Einige dieser Techniken werden bereits weltweit auch in der praktischen Tierproduktion angewendet. Beispiele hierfür sind der Embryotransfer und z.T. auch schon die mikrochirurgische Erstellung monozygoter Zwillinge.

Hingegen kommt Verfahren wie dem experimentell induzierten Chimärismus, dem Nucleustransfer oder dem Gentransfer derzeit in erster Linie wissenschaftliche Bedeutung zu.

Da bei landwirtschaftlichen Nutztieren die Gewinnung von Embryonen mit großem Aufwand verbunden und vor allem bei uniparen Tieren zahlenmäßig sehr limitiert ist, wurden die meisten dieser Biotechniken an Versuchstierspezies erforscht.

Um entsprechende Untersuchungen im notwendigen Umfang auch an landwirtschaftlichen Nutztieren durchführen zu können und um diese neuen Biotechniken in die tierische Produktion einzuführen, wäre vor allem beim Rind die kostengünstige Bereitstellung von Embryonen eine grundlegende Voraussetzung. Hierbei käme vor allem der Verfügbarkeit früher Embryonalstadien eine große Bedeutung zu, da diese mit herkömmlichen Methoden nur durch eine sehr aufwendige chirurgische Eileiterspülung zu gewinnen sind.

Im Rahmen der am Lehrstuhl für Tierzucht laufenden Forschungsvorhaben soll eine Möglichkeit zur kostengünstigen in vitro Produktion von Rinderzygoten erforscht werden. Hierbei steht die in vitro Reifung weiblicher Keimzellen im Mittelpunkt der Untersuchungen.

2. LITERATUR

2.1 Physiologie der Reifung von Oozyten

2.1.1 Ursprung und Entwicklung der Keimzellen

Die weiblichen Keimzellen entstammen dem Dottersackendoderm, wandern während der frühen Embryonalentwicklung in die indifferente Anlage der Keimdrüse und werden bei der Umbildung dieser indifferenter Anlage zum Ovar zu Ureizellen (EPEL, 1983). Als primordiale weibliche Geschlechtszellen gelangen diese in das Innere der Ovars, wo sie sich intensiv teilen (Vermehrungsperiode). Nach dieser Vermehrungsperiode, die meist noch vor der Geburt abgeschlossen ist, ist die Zahl der Keimzellen festgelegt und im Laufe des Lebens eines Individuums folgt keine Vermehrung mehr (MICHEL, 1977). Eine Besonderheit der Keimzellentwicklung ist zu diesem Zeitpunkt das Vorhandensein interzellulärer Brücken zwischen benachbarten Zellen. Diese Zellen unterscheiden sich weder im Kern noch im Zytoplasma. Vermutlich ist ihre spezifische strukturelle Anordnung im Zusammenhang mit einem Regulationsmechanismus zu sehen (CRAN und MOOR, 1980). Nach der letzten mitotischen Teilung tritt die Eizelle in eine praemeiotische Interphase, in der es zum letzten Mal vor der Fertilisation zu einer DNA-Synthese kommt. Obwohl mit dieser DNA-Synthese die Meiose bereits begonnen hat, setzt sich diese nur bis zum Diplotän fort, in dem das Chromatin dekondensiert, die Kernumhüllung wieder ausgebildet wird und die Oocyte somit das Germinalvesikel - Stadium erreicht hat. Dieser Zeitraum der meiotischen "Ruhe" kann - je nach Dauer des praepubertären und fortpflanzungsfähigen Lebensabschnitts - sehr lange dauern (RICHARDS, 1978; TSAFIRI, 1978; CRAN und MOOR, 1980; EPEL, 1983). Die Signale, die die Meiose regulieren, sind im einzelnen unbekannt, auf Grund der Lokalisation des Auftretens kann man jedoch vermuten, daß Zellen mesonephrischen Ursprungs - das rete ovarii - induzierende Stimuli produzieren, wohingegen die Granulosa-zellen, die die Keimzellen umgeben, meiosehemmende Inhibitoren produzieren (FOOTE und THIBAUT, 1969; GONDOS, 1978; PETERS, 1978).

Induktion und Hemmung der Meiose werden durch entgegengesetzt wirkende Regulationsmechanismen im Gleichgewicht gehalten (CRAN und MOOR, 1980). Die Umhüllung der Oocyte durch eine einschichtige Lage von Zellen, auch Follikulogenese genannt, vollzieht sich in einer kurzen, definierten

Periode zur Zeit der Geburt bzw. kurz danach. Sobald die Umhüllung vollständig ist, kommt es zu keiner weiteren Veränderung am sogenannten Primordialfollikel bis das Follikelwachstum stimuliert wird. Primordiale Follikel stellen also eine ruhende Quelle dar, aus der eine geringe Anzahl von Follikeln zu weiterem Wachstum stimuliert wird (MICHEL, 1977; RICHARDS und MIDGLEY, 1976; PETERS, 1978; TSAFIRI, 1978; CRAN und MOOR, 1980).

2.1.2 Follikelwachstum

Der Anstoß zum Follikelwachstum basiert vermutlich auf einem frühen Gonadotropinstimulus (PETERS, 1978 und 1979). Gonadotropine sind Peptidhormone, die von der Hypophyse gebildet werden, wobei FSH (Follikelstimulierendes Hormon) und LH (luteinisierendes Hormon) zu den wichtigsten gehören und an zahlreichen regulatorischen Funktionen der Fortpflanzungsorgane beteiligt sind.

Die Oozyte wird von einer Zona pellucida (Oolemma) umgeben und vollzieht ein rasches Wachstum, das von intensiver metabolischer Aktivität und der Entwicklung zahlreicher Zellfortsätze, die die Absorptionskapazität erhöhen, begleitet wird. Gleichzeitig nehmen Fortsätze der Granulosazellen Kontakt mit der Oozytenoberfläche auf (PETERS, 1978; CRAN und MOOR, 1980). Das beim Primärfollikel in einer einschichtigen Lage vorhandene Follikelepithel bildet beim Sekundärfollikel mehrere Schichten von Zellen. Sobald sich 5-6 Lagen von Granulosazellen gebildet haben, verschmelzen flüssigkeitsgefüllte Zwischenräume zu einem großen Hohlraum und bilden damit die Follikelhöhle (Antrum). Der Sekundärfollikel wird somit zum Tertiärfollikel, Bläschenfollikel oder Graaf'schen Follikel. Zur selben Zeit bildet das umgebende Bindegewebe unter dem Einfluß von Granulosazellen die zweischichtige Theca folliculi. Follikelepithelzellen und Thecazellen bilden später unter Einfluß von FSH und ICSH (Interstitialzell stimulierendes Hormon) Östrogene. Der Follikel wird dadurch gleichzeitig zu einem wichtigen Hormonbildner (MICHEL, 1977).



2.1.3 Selektion

Die Gesamtzahl der Keimzellen im Säugetierovar übersteigt bei weitem die Zahl derer, die im Laufe des Lebens ovuliert werden, obwohl nach der Geburt keine Ergänzung des Keimzellstammes erfolgt. Dies

verdeutlicht die Kernfrage, nämlich nach welchen Kriterien die Selektion von Keimzellen und Follikeln vollzogen wird. Was z.B. bestimmt, welcher Follikel in der Ruhephase bleibt, welcher dem Wachstumspool zugeordnet wird und auf welche Art und Weise in jedem Zyklus eine bestimmte, tierartlich spezifische Anzahl an Oozyten zur Ovulation kommt?

Selektive Mechanismen setzen in verschiedenen Stadien der Entwicklung an. Zunächst degenerieren viele Keimzellen am Ende der mitotischen Phase, während nur ein geringer Prozentsatz in die Meiose eintritt und zu Primäroozyten wird (GONDOS, 1978). Viele Primäroozyten degenerieren, ehe sie das Stadium des Primordialfollikels erreichen (PETERS, 1978). Schließlich wird nur eine geringe konstante Anzahl von Primordialfollikeln zum Wachstum angeregt. Befindet sich die Oozyte im sog. Wachstumspool, endet die weitere Entwicklung entweder in der Ovulation oder, wesentlich häufiger, in Follikelatresie und Zelltod (HAY et al., 1976).

Anhand welcher Kriterien die Oozyten ausgewählt werden ist nahezu unbekannt. Follikel, die den Wachstumspool verlassen (durch Atresie oder Ovulation), werden laufend ergänzt. Jede Reduktion der Anzahl ruhender Follikel bewirkt jedoch auch eine Reduktion der Anzahl der Follikel, die in den Wachstumspool eingehen, sodaß die Gesamtzahl der ruhenden Follikel letztlich die Größe des Wachstumspools bestimmt (RICHARDS, 1978). Diesem ständigen Durchfluß wachsender Follikel ist ein zyklisches Schema zirkulierender Hormone übergeordnet, wobei die wichtigsten FSH und Östrogen sind (THIBAUT, 1977).

Die Follikel, deren Entwicklung exakt mit dem Zeitpunkt maximaler FSH-Freisetzung synchron sind, entwickeln sich normal und ovulieren, während andere zugrunde gehen (CRAN und MOOR, 1980). Die zelluläre Antwort auf Gonadotropine ist die Entwicklung von Hormonrezeptoren in den Granulosazellen von Follikeln, die zur Ovulation bestimmt sind (RICHARDS und MIDGLEY, 1976; HUNZICKER-DUN et al., 1979). FSH wirkt synergistisch mit Östrogen, indem es die Bildung von LH-Rezeptoren bewirkt. Östrogen hat daneben mitosefördernde Eigenschaften und ist somit für die Stimulierung des Follikelwachstums von Bedeutung. Außerdem beeinflußt es die Mikrozirkulation in der Theka folliculi positiv und vergrößert das Ausmaß der Interzellulären Verbindung zwischen den Follikelzellen (HEAP und ILLINGWORTH, 1977). Unter diesem

kombinierten Einfluß von FSH und Östrogen wachsen Follikel sehr schnell und können so auf die LH-Sekretion reagieren (THIBAUT, 1977). Die Bindung von LH an die Granulosazellen beendet das Follikelwachstum, verändert die Steroidsekretion und verursacht Reifungsveränderungen in der Oozyte als Vorbereitung auf die Fertilisation. In vitro Versuche deuten darauf hin, daß LH die hemmende Funktion von Follikelflüssigkeit und Granulosazellen aufhebt (TSAFIRI, 1978; MOOR und WARNES, 1978). Der Follikelsprung und die Freisetzung einer oder mehreren Oozyten vollenden den Follikelzyklus, nicht aktivierte Follikel werden atretisch.

2.1.4 Atresie

Die Atresie ist das Schicksal der großen Mehrheit der ovariellen Follikel. Dieser degenerative Prozess ist, sobald er eingeleitet ist fortschreitend und endet letztendlich in der Auflösung von erkennbaren Follikelstrukturen. Als auslösende Faktoren wurden verschiedene Mechanismen diskutiert. Gemäß der obengenannten Rezeptortheorie könnten alle Follikel, die ihre kritische hormonabhängige Phase nicht synchron mit dem Hormon-Zyklus erreichen, keine normale Differenzierung vollziehen. Die daraus folgende zelluläre Degeneration wird den kumulierenden Effekten solcher Abweichungen zugeschrieben: wie ungenügender Rezeptorentwicklung, veränderter Steroidbildung und zunehmender Aktivität hydrolytischer Enzyme innerhalb der Follikelzellen.

Zusätzlich tragen Veränderungen in der Mikrozirkulation, durch die es zu einer Reduktion der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der avaskulären Membrana granulosa kommt, zum Prozess der Atresie bei (HAY et al., 1976; BYSKOV, 1978; CLARK et al., 1979; CONDON et al., 1979; CRAN und MOOR, 1980).

2.1.5 Der ovulierende Follikel

Während des Wachstums der prädestinierten Follikel kommt es zu einem geordneten Ablauf von hormonellen und morphologischen Ereignissen. In ganz kleinen Follikeln sind die hauptsächlich sezernierten Steroide Androgene mit einem geringen Anteil an Östrogenen. Mit zunehmender Follikelgröße nimmt der Anteil an Östrogen zu, bis eine ausreichende Konzentration erreicht ist, um die LH-Ausschüttung aus der Hypophyse

zu bewirken. Die daraus resultierende hohe Konzentration von LH wirkt wiederum auf den Follikel, beendet die Östrogensekretion und regt die Progesteronproduktion an (MC NATTY, 1978; DIELEMAN et al., 1983). Aufgrund von morphologischen Veränderungen in Membrana basalis, Membrana granulosa und Theca interna und möglicherweise auch durch enzymatischen Einfluß bricht die Follikelwand und die Eizelle wird freigesetzt.

Es gibt eine zunehmende Anzahl von Hinweisen darauf, daß Oozyten in Follikeln zwar die Fähigkeit besitzen, die Meiose zu vollenden, dies aber durch Hemmstoffe follikulären Ursprungs verhindert wird. Ein Bestandteil dieses hemmenden Komplexes ist ein kleines Protein, dessen Wirkung auf die Oozyte durch die umgebenden Cumuluszellen vermittelt wird (CHANG, 1955; MOOR und WARNES, 1978; CHANNING, 1979). Ein zweiter Hemmstoff wird direkt über interzelluläre Transportmechanismen in die Oozyte übertragen. Das Molekül, das an diesem Mechanismus am wahrscheinlichsten beteiligt ist, ist das c-AMP, das neben seiner Rolle als Mediator bei der Steroidbildung die Mitose in somatischen Zellen reguliert. Es wurde eine Vielzahl von Experimenten durchgeführt, die darauf abzielten, die Rolle des c-AMP näher zu beleuchten (zur Übersicht siehe MOOR und HESLOP, 1981). Die Ergebnisse sind z.T. widersprüchlich, was darauf hindeutet, daß c-AMP je nach Ort des Auftretens eine unterschiedliche Wirkung hat. Ein kurzzeitiger Anstieg des c-AMP in der Follikelflüssigkeit könnte anschließend die Fortsetzung der Meiose zulassen (möglicher LH-Wirkungsmechanismus), wohingegen dauerhaft hohe Konzentrationen an c-AMP die Meiose blockieren (CHANNING, 1979). Es ist wahrscheinlich, daß eine Reduktion der interzellulären Verbindungen zwischen der Oozyte und den umgebenden Zellen zu einem erniedrigten Spiegel von c-AMP in der Oozyte führt. Analog zur Amphibienoozyte kommt es durch eine Senkung des c-AMP Spiegels ebenfalls zu einem Absinken der katalytischen Untereinheit einer c-AMP abhängigen Proteinkinase und damit zu einer Unterdrückung der Bildung eines hemmenden Phosphoproteins. Die Meiose wird fortgesetzt, sobald der Spiegel dieses Phosphoproteins unter eine kritische Konzentration fällt (CRAN und MOOR, 1980).

Daß die Oozyte von den umgebenden Follikelzellen "abgekoppelt" wird, konnte sowohl in elektrophysikalischen als auch in metabolischen Experimenten nachgewiesen werden (GILULA et al., 1978). Die Loslösung der Cumuluszellen von der Oozyte tritt schlagartig ungefähr zur Halbzeit

der Reifungsperiode auf (GONDOS, 1978). Gonadotropine, v.a. FSH, sind dafür physiologisch am wichtigsten. Obwohl Steroide einen Einfluß auf die normale Funktion der gap junctions haben, scheinen sie nicht als spezifisch lösende Stoffe zu wirken.

Neben den obengenannten Veränderungen erhöht LH in hoher Konzentration die Rate des Aminosäuretransports durch die Oozytenplasmamembran und verändert das Spektrum der synthetisierten Proteine. Obwohl die regulierenden Mechanismen für diese Veränderungen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, wird deutlich, daß diese intrazellulären Veränderungen für normale Befruchtung und Teilung essentiell sind. Ein zweites oder alternatives Ergebnis der Unterbrechung der interzellulären Kommunikation zwischen Oocyte und den umgebenden Zellen wurde diskutiert. Während der Oozytenreifung werden vom Golgiapparat zahlreiche kleine Granula (corticale Granula) gebildet. Bei der Befruchtung verschmelzen diese mit der Plasmamembran und bilden somit die sog. Befruchtungsmembran, der allgemein die Rolle zugesprochen wird, das Eindringen von überzähligen Spermien zu verhindern. Der Verlust des Zellkontaktes mit dem Cumulus könnte die exakte Aufreihung dieser Granula unterhalb der Plasmamembran als Vorbereitung auf die Befruchtung bewirken (CRAN und MOOR, 1980).

2.1.6 Biosynthetische Aktivität reifender Oozyten

Die molekularen Grundlagen der Oozytenreifung bei Säugetieren sind bislang noch weitgehend unbekannt.

2.1.6.1 RNA-Synthese

Durch radioaktive Markierung in vivo konnte gezeigt werden, daß während des Oozytenwachstums in hohem Maße RNA synthetisiert wird, wohingegen ein starker Abfall der RNA Synthese zu beobachten ist, sobald die Oocyte ihre endgültige Größe erreicht hat. Allerdings wird in geringem Umfang bis zum Stadium der Chromatinkondensation der Reifungsphase weiterhin RNA synthetisiert. Es gibt keine Informationen darüber, ob neue RNA während des Reifungsprozesses produziert wird, wohingegen die Analyse der synthetisierten Proteine einen Hinweis auf unterschiedliche RNA Schablonen für die Translation sein könnte (MOOR und WARNES, 1978).

2.1.6.2 Protein-Synthese

Extrafollikuläre Oozyten, die die erste meiotische Teilung *in vitro* vollzogen, wurden von verschiedenen Tierarten untersucht, um festzustellen, ob Induktion und Fortsetzung der Meiose mit spezifischen Veränderungen in der Proteinsynthese korreliert sind. Quantitative Aspekte der Leucin-Aufnahme und des Einbaus wurden in Metaphase I und II von Mäuseoozyten untersucht. Dabei wurden Unterschiede in der Aufnahme, jedoch nicht im Einbau festgestellt, wobei die Aufnahme in Gegenwart von Cumuluszellen erhöht ist, und zwar solange, bis sich die Zellfortsätze der Cumuluszellen von der Oozyte trennen (CROSS und BRINSTER, 1974). Qualitative Untersuchungen der Proteinsynthese an extrafollikulären Oozyten haben gezeigt, daß einige Veränderungen in der Proteinsynthese zu verschiedenen Stadien der Meiose auftreten. Bei Mäuseoozyten verändert sich das Proteinmuster (GOLBUS und STEIN, 1976). Ähnliche Veränderungen wurden bei Schwein und Kaninchen beobachtet, wobei diese sowohl die Neusynthese von Proteinen, als auch die Unterbrechung der Synthese oder die Modifizierung bestehender Proteine betraf (MC GAUPHEY und VAN BLERKOM, 1977). Unklar ist noch, ob die beobachteten Veränderungen in kausalem Zusammenhang mit der Meiose oder mit der Entfernung der Oozyte aus dem Follikel stehen. Da jedoch nahezu alle Veränderungen nach der Auflösung des Germinalvesikels auftreten wird vermutet, daß diese in engem Zusammenhang mit der Vermischung von Zytoplasma und Nucleoplasma stehen (SCHULTZ und WASSARMANN, 1977).

Auch der Alterungsprozess der Oozyte könnte eine Veränderung der Proteinsynthese bewirken. Unbefruchtete Schafeizellen, die nach 7 Tagen aus dem Eileiter gewonnen wurden, behielten die Fähigkeit, Proteine zu synthetisieren, wobei allerdings das Proteinmuster stark von dem frisch ovulierter Oozyten abwich. Bislang wurde noch kein Protein gefunden, dessen Synthese einzig und allein im Zusammenhang mit der Meiose steht (MOOR und WARNES, 1978).

Es wird vermutet, daß die Ursache dafür, daß Oozyten, die die Meiose *in vitro* vollendet haben, sich nach Transfer und Insemination nicht normal entwickeln, in einer ungenügenden Zytoplasmareifung begründet liegt. Mit Hilfe von Elektrophorese und Fluorographie wurden deshalb die Proteinmuster von *in vivo* und intrafollikulär *in vitro* gereiften Schafoozyten verglichen (WARNES et al., 1977). In den *in vivo* Unter-

suchungen zeigte sich, daß 12 Banden während der Reifung eine Veränderung erfuhren. Bei den *in vitro* Studien wurden die gleichen Veränderungen beobachtet, sowohl was die Art als auch die Zeit des Auftretens betrifft. Oozyten, die 15 Stunden außerhalb des Follikels *in vitro* kultiviert wurden, wiesen ein unverändertes Ausgangsmuster auf, so daß man annehmen kann, daß die Veränderungen des Proteilmusters unabhängig von meiotischen Veränderungen sind und auch nicht einfach durch die Entfernung der Eizelle aus dem Follikel ausgelöst werden. Folglich müssen die Veränderungen in der Proteinsynthese zeitlich mit der physiologischen Reifung gekoppelt sein (MOOR und TROUNSON, 1977). Allerdings konnte noch nicht geklärt werden, ob die Proteinveränderungen per se ausschlaggebend für eine vollständige physiologische Reifung und damit für eine ungestörte Fertilisation sind.

2.1.6.3 Energiebedarf der reifenden Oozyte

Für die Vollendung der Meiose sind offensichtlich aerobe Verhältnisse nötig, da die Meiose durch Cyanid oder anaerobe Verhältnisse gehemmt wird (HAIDRI et al., 1971; ZEILMAKER und VERHAMME, 1974). Substrate, die für die nackte Oozyte verwertbar sind, beschränken sich auf Pyruvat und Oxalacetat. Bei Ratte und Maus ist in geringem Umfang Lactat metabolisierbar (BIGGERS et al., 1967; ZEILMAKER et al., 1972). Mäuse-Cumuluszellen können Pyruvat aus Glucose synthetisieren (DONAHUE und STERN, 1968) und auch Coronazellen der Ratte metabolisieren Glucose (HILLENSJÖ et al., 1975). Das Vorhandensein von Coronazellen beeinflußt die Aufnahme von Aminosäuren und könnte auf diese Art und Weise die metabolische Aktivität von Oozyten regulieren, vor allem vor dem Kontaktverlust, also in der frühen Meiose (CROSS und BRINSTER, 1974).

2.2 In vitro Reifung von Oozyten bei verschiedenen Versuchs- und Nutztieren

2.2.1 Geschichte

Die ersten Versuche, Säugetieroozyten *in vitro* zu inkubieren, wurden von PINCUS und ENZMANN (1935) durchgeführt. Durch Follikelpunktion gewannen sie Oozyten von Kaninchen und inkubierten diese in Kaninchen-Blutplasma. Hierbei stellten sie fest, daß die Kaninchenoozyten in-

in vitro die Meiose fortsetzten und zwar unabhängig von einem direkten Einfluß von Hypophysenhormonen.

Großen Aufschwung erhielt dieses Forschungsgebiet durch die Berichte von CHANG (1955). In seinen Versuchen konnte er nach Kultur von unreifen Oozyten in Kaninchenserum bei der Mehrzahl der Eizellen eine Kernreifung (Bildung des 1. Polkörperchens) beobachten, gleich welchen Ursprungs die Oozyten waren. Nach Transfer von Oozyten in gedeckte oder künstlich besamte Empfängertiere betrug die Befruchtungsrate 35 bzw. 19 %, wobei die Befruchtung erst nach Ausbildung des 1. Polkörperchens auftrat. Die Befruchtungsrate konnte nach 12-stündiger Vorkultur der Oozyten erheblich gesteigert werden. 3 von insgesamt 86 unterschiedlich behandelten Embryonen wiesen eine normale Entwicklung auf. In ungedeckten Empfängertieren konnte eine parthenogenetische Entwicklung bis zum Blastozystenstadium beobachtet werden. Chang kam bei seinen Experimenten zu der Erkenntnis, daß die Erlangung der Befruchtungsfähigkeit und die normale Entwicklung fertilisierter Eizellen ein physiologisches Phänomen des Ooplasmas als Gesamtheit darstellt und nicht nur ein Faktor der Kernreifung ist.

Eine Vielzahl der nachfolgenden Experimente bei den verschiedensten Tierarten zielten darauf ab, die einflußnehmenden Faktoren auf die Reifung der gesamten Eizelle zu untersuchen.

2.2.2 Hormoneinfluß

Die Mehrzahl der Untersuchungen bezüglich des Hormoneinflusses auf die Oozytenreifung befaßte sich mit den Gonadotropinen, vornehmlich mit der Wirkung von FSH und LH. Die meisten Ergebnisse deuteten auf einen positiven Einfluß hin. Nur wenige Autoren bestätigen dies nicht. So konnten TSAFIRI et al. (1972) und MEINECKE et al. (1983) bei der Ratte bzw. beim Schwein keinen Einfluß von Gonadotropinen feststellen, wobei letztere postulierten, daß eine vollständige Oozytenreifung nur im intakten Follikel möglich sei. EDWARDS (1962) beobachtete bei verschiedenen Säugerspezies, daß Oozyten in vitro auch ohne Hypophysenhormone die Meiose fortsetzen, Mäuseoozyten sogar in reiner Kochsalzlösung. Er folgerte daraus, daß vom Follikel eine hemmende Wirkung auf die Oozytenreifung ausginge. KAPLAN et al. (1978) beobachteten bei der Ratte unter LH-Einfluß einen beschleunigten Bruch des Germinalvesikels und SHALGI et al. (1979) stellten ebenfalls bei der Ratte einen posi-

tiven Einfluß von LH auf die Reifung und Fertilisation (im Eileiter) fest, was sogar zu einer normalen Entwicklung von Foeten führte. Eine Hypophysektomie 7-17 Wochen vor der Oozytengewinnung hatte bei der Maus deutlich geringere Reifungszahlen *in vitro* zur Folge, die teilweise durch Hormongaben kompensierbar waren (MOORE-SMITH und TENNEY, 1979). Auch beim Rhesus-Affen konnte ein positiver LH-Einfluß beobachtet werden, der jedoch lediglich als Reifungsinitiation gedeutet wurde, da die räumliche Anordnung der Metaphasespindel nicht mit der bei *in vivo* gereiften Oozyten übereinstimmte (GOULD und GRAHAM, 1976). Eine gesteigerte Entwicklungsfähigkeit konnte bei extrafollikulär/*in vitro* gereiften Schafoozyten durch Gonadotropinzugabe erreicht werden. Die Rate lag jedoch im Vergleich zu intrafollikulär/*in vitro* gereiften Oozyten bei maximal 50 % (CROSBY et al., 1981).

Sehr umfangreiche Untersuchungen über den Einfluß von Steroiden bei der Reifung von Schafoozyten liegen von MOOR vor. Er postulierte eine anfängliche Induktionsperiode innerhalb des Follikels von mindestens 6-8 h als Grundvoraussetzung für eine vollständige Reifung von Oozyten, wobei er einem charakteristischen Steroidmuster eine wichtige Rolle zuschrieb. Demnach seien erhebliche Steroidkonzentrationen für eine vollständige Zytoplasmareifung notwendig (MOOR, 1978). Als Maßstab für den Steroideinfluß nahm er beispielsweise die Vorkernentwicklung. Eine Herabsetzung der Steroidsekretion verringerte den Anteil normaler Oozyten, wobei als kritischer Zeitpunkt vor allem der Beginn der Reifung anzusehen ist (MOOR et al., 1980).

Ein positiver Einfluß von Steroiden konnte auch bei der Ratte und beim Rhesus-Affen beobachtet werden (TSAFIRI et al., 1972; GOULD und GRAHAM, 1976). Von entscheidender Bedeutung für die Reifungsgeschwindigkeit erwies sich Progesteron beim Kaninchen (BAE und FOOTE, 1975 b).

Dahingegen stellten RICHTER und MC GAUGHEY (1979) einen hemmenden Einfluß von 17- β Östradiol auf Schweineoozyten fest, wobei die Aufnahme hauptsächlich durch die Granulosazellen erfolgt, was auf einen Regulationsmechanismus hinweist. Mäuseoozyten wurden durch Steroide reversibel in der Reifung gehemmt (EPPIG und KOIDE, 1978; MOORE-SMITH und TENNEY, 1980). Eine endogene Hemmung der Steroidsynthese hatte auf die Kernreifung von Rattenoozyten keinen Einfluß.

2.2.3 Cumulus oophorus und Follikelzellen

Die Ergebnisse der Untersuchungen, die sich mit der Rolle der Cumuluszellen befassen, verdeutlichen, daß diese einen großen Einfluß auf die Kernreifung haben und für zytoplasmatische Reifungsvorgänge, die an Fertilisation und Weiterentwicklung gemessen werden können, essentiell sind.

So fand MAGNUSSON (1980) bei der Ratte einen entscheidenden Einfluß auf den Metabolismus der Oozyten. Nach Entfernung der Cumuluszellen war der O_2 -Verbrauch im Vergleich zu Oozyten mit intaktem Cumulus-oophorus deutlich geringer, wohingegen auf Rate und zeitlichen Verlauf der Kernreifung kein Einfluß zu beobachten war. Ebenfalls bei der Ratte beschrieben DEKEL und BEERS (1980), daß Gonadotropine nur bei Oozyten mit intaktem Cumulus die Wirkung von Reifungshemmern (c-AMP-Derivate, Phosphodiesterasehemmer) aufheben konnten. Sie postulierten daher, daß die Wirkung der Gonadotropine über die Cumuluszellen vermittelt würde. Mäuseoozyten, die ohne Cumuluszellen gereift wurden, wiesen nach In-vitro Fertilisation um ca. 50 % niedrigere Fertilisationsraten auf (CROSS und BRINSTER, 1970).

Beim Schwein führte die Denudation zu einer erheblichen Beeinträchtigung der in vitro Reifung, die nur durch Zusatz von Follikelflüssigkeit aus Graaf'schen Follikeln zum Reifungsmedium aufgehoben werden konnte (MEINECKE und MEINECKE-TILLMANN, 1978). Auch beim Schaf erwies sich das Vorhandensein von Cumuluszellen als essentiell, da bei denudiert gereiften Oozyten nach der Fertilisation fast keine Teilungen beobachtet wurden.

Der entscheidende Einfluß von Follikelzellen auf die Oozytenreifung wird deutlich, wenn man die Ergebnisse betrachtet, die durch in vitro Kultur explantierter Follikel erzielt werden konnten. Eine physiologische Oozytenreifung ist durch diese Methode sehr gut erreichbar (THIBAULT et al., 1975; MOOR und TROUNSON, 1977). Als Konsequenz dieser Ergebnisse kultivierten STAIGMILLER und MOOR (1984) Schafoozyten in verschiedenen Kombinationen mit Follikelzellen in einem nichtstatischen System in hormonhaltigen Medien. Eine physiologische Reifung konnte nach Transfer in inseminierte Empfängertiere durch die Geburt von Lämmern bewiesen werden.

2.2.4 Proteinbiosynthese

Komplexe Proteinveränderungen sind vermutlich ein Bestandteil einer physiologischen Oozytenreifung. MC GAUGHEY und VAN BLERKOM (1977) beobachteten bei Schweineeizellen im Zuge der Reifung eine komplexe Veränderung der Polypeptidstrukturen, wobei es im Zuge der Kernreifung zum Auftreten von bestimmten Markern kam, die für das jeweilige Stadium charakteristisch waren.

Ein deutlich verändertes Synthesemuster von Proteinen wiesen *in vitro* kultivierte Schafoozyten im Vergleich zu *in vivo* gereiften Eizellen auf (MOOR und WARNES, 1978). Ein gleiches Ergebnis brachte der Vergleich mit Kulturen in explantierten Follikeln (CROSBY et al., 1981). Säugeroozyten, die ohne Cumuluszellen kultiviert wurden, wiesen eine deutliche Verringerung der Actinbande auf (OSBORN und MOOR, 1982). Vermutlich spielen die Proteinveränderungen während der Reifung vor allem für einen physiologischen Ablauf der Fertilisation eine Rolle. Hinweisgebend hierfür sind Versuche von MOTLIK et al. (1980) bei Kaninchen und Schwein. Sie fanden heraus, daß es in vollständig ausgebildeten Vorkernen zu einer Anreicherung bestimmter, markierter Proteine kommt.

2.2.5 Physiologische Meiose-Hemmstoffe und c-AMP

Die Zugabe von c-AMP zu Oozytenkulturen verschiedener Spezies verhindert die Vollendung der Meiose *in vitro* (MAGNUSSON und HILLENSJÖ, 1977; JAGIELLO et al., 1981). HILLENSJÖ et al. (1978) stellten nach Untersuchungen bei der Ratte die Hypothese auf, daß c-AMP der Mediator der LH-induzierten Glycolyse der Oozyte sei. Folglich müßte man zwischen einer spezifischen und einer unspezifischen Wirkung des c-AMP unterscheiden. Auch in anderen Zellsystemen scheint die Gonadatropinwirkung durch c-AMP vermittelt zu werden (BALL et al., 1984).

Die hemmende Wirkung von c-AMP ist unabhängig vom Zeitpunkt des Einwirkens reversibel. Die Vermutung geht dahin, daß die Oozyte durch hohe intrazelluläre Konzentration an c-AMP in einem ruhenden Stadium gehalten wird. Ein Abfall von c-AMP könnte dann eine Dephosphorylierung eines Phosphoproteins bewirken, welches in diesem aktivierten Zustand wiederum den Bruch des Germinalvesikels initiiert (SCHULTZ und WASSARMANN, 1977). Die Aufrechterhaltung der hohen c-AMP Konzentrationen könnte durch die Cumuluszellen bewirkt werden. Kommt es durch Gonado-

tropineinwirkung zu einer Lösung der Zellverbindungen zwischen Oozyte und Cumuluszellen, so würde dieser Nachschub unterbrochen (BALL et al., 1984). Auch der Calcium-Stoffwechsel der Oozyte ist in diesem Zusammenhang zu sehen. POWERS und PALEOS (1982) fanden an Mäuseoozyten heraus, daß die hemmende Wirkung von c-AMP durch Substanzen potentielliert werden kann, die die Ca-Aufnahme verhindern und umgekehrt diese Wirkung durch verstärkte Ca-Aufnahme reduziert wird.

Ein weiterer Regulationsfaktor trägt dazu bei, einen Großteil der Oozyten in der Ruhephase zu halten. Hierbei handelt es sich um bestimmte Proteinfractionen der Follikelflüssigkeit. Hamsteroozyten werden durch solche Fraktionen der Follikelflüssigkeit in ihrer Reifung gehemmt, wobei diese Hemmung durch Gonadotropine aufgehoben werden kann, bzw. die Konzentration des Hemmstoffes (OMI = oocyte maturation inhibitor) in der Follikelflüssigkeit durch Gonadotropineinfluß herabgesetzt wird (GWATKIN und ANDERSEN; 1976).

Andere Untersuchungen existieren vom Schwein. Hier wirken niedermolekulare Fraktionen der Follikelflüssigkeit hemmend auf die Progesteronsynthese von Cumuluszellen und die Reifung der Oozyten, was wiederum durch FSH und LH aufgehoben werden kann (HILLENSJÖ et al., 1980). Ebenfalls durch Zugabe von LH läßt sich die hemmende Wirkung aufheben, die beim Schwein durch bestimmte Segmente der Follikelwand ausgeübt wird, wenn diese als Organkulturen zusammen mit Oozyten inkubiert werden (LEIBFRIED und FIRST, 1980).

2.2.6 Verschiedene Medien und Substrate

Vor allem frühere Untersuchungen befassten sich mit der Frage, welche Bedingungen ein Medium erfüllen muß, damit Oozyten in vitro reifen. Als Maßstab wurde hier hauptsächlich die Kernreifung genommen, also die Fortsetzung der Meiose, was wie man heute weiß nur einen Teil der Oozytenreifung darstellt. Bei den meisten der untersuchten Säugerspezies genügen schon einfachste Kulturbedingungen für die Fortsetzung der Meiose in vitro. So gelang es z.B. EDWARDS (1962), Mäuseoozyten in physiologischer Kochsalzlösung zu reifen. Er postulierte daraufhin, daß der die Meiose unterbindende Einfluß von follikulären Strukturen ausgeübt wird. Diese Hypothese wurde durch spätere Untersuchungen bestätigt (GWATKIN und ANDERSEN, 1976; HILLENSJÖ et al., 1980; LEIBFRIED und FIRST, 1980). Bei zahlreichen Experimenten verwendete man Medien, wie

sie vor allem für Zellkulturen Anwendung fanden. So erwies sich eine Kultur von Schafoozyten in einem solchen Wachstumsmedium der Kultur in Follikelflüssigkeit überlegen, wobei Rinderfollikelflüssigkeit am ungeeignetsten war (QUIRKE und GORDON, 1971).

Der Zusatz von 15 % Serum zum Reifungsmedium beeinflusste die Fertilisationsfähigkeit von Mäuseoozyten erheblich (CROSS und BRINSTER; 1970). Allgemein gilt der Zusatz von artspezifischem Serum oder Bovinem Serum Albumin (BSA) als Proteinquelle als unerlässlich. Der Zusatz von Pyruvat, Lactat oder Glucose erwies sich für die Reifung von Kaninchenoozyten als gleichermaßen vorteilhaft für die Kulturen, jedoch nicht als essentiell für die Kernreifung. Auch Aminosäuren hatten einen positiven Einfluß auf die Stoffwechselaktivität der Oozyten, wobei die Kulturen nach Glutaminzusatz die höchsten Stickstoffproduktionen aufwiesen (BAE und FOOTE, 1975 a). Ebenfalls an Kaninchenoozyten untersuchten BAE und FOOTE (1980) variable Osmolaritäten, wobei die optimale Osmolarität von Kulturmedien unter der des Blutserums lag.

2.2.7 Nachkommen aus in vitro gereiften Oozyten

Eine normale Entwicklung nach Fertilisation in vitro gereifter Oozyten wurde bislang bei folgenden Tierarten beschrieben (Rind siehe 2.3):

- Maus : In vitro Reifung der Oozyten, IVF, 15 Tage alte Foeten (CROSS und BRINSTER, 1970)
- Kaninchen: In vitro Reifung der Oozyten, in vivo Fertilisation, lebende Junge (CHANG, 1955)
In vitro Reifung der Oozyten, in vivo Fertilisation, Entwicklung zu expandierten Blastozysten (VAN BLERKOM und MC GAUGHEY, 1978)
- Ratte : In vitro Reifung der Oozyten, in vivo Fertilisation, lebende Junge (SHALGI et al., 1979)
- Schaf : In vitro Reifung der Oozyten in Cokultur mit Granulosazellen, in vivo Fertilisation, lebende Junge (STAIGMILLER und MOOR, 1984)
- Schaf : In vitro Reifung der Oozyten in Cokultur mit Granulosazellen, IVF, lebende Junge (CHENG et al., 1986)

2.3 In vitro Reifung von Rinderoozyten

Auch die Experimente mit Rinderoozyten zielten darauf ab, Reifungsmedien und Inkubationssysteme dahingehend zu optimieren, daß eine möglichst hohe Anzahl von Oozyten die Meiose vollendet. Im Wesentlichen sollten jedoch die Faktoren untersucht werden, die eine vollständige Reifung der Oozyten beeinflussen und damit auch die Fertilisierbarkeit und Weiterentwicklungskapazität. Analog zu anderen Säugetieren (siehe 2.2) sind auch beim Rind Gonadotropine für die Fortsetzung der Meiose in vivo verantwortlich. Auch in vitro haben Gonadotropine einen positiven Einfluß auf Kernreifung, Cumulusexpansion und Fertilisierbarkeit, wobei vor allem FSH untersucht wurde (BALL et al., 1983). Als optimale Dosis wurde von HENSLEIGH und HUNTER (1985) $1 \mu\text{g}$ FSH/ml Inkubationsmedium ermittelt. Über den Einfluß von Steroiden liegen widersprüchliche Angaben vor. Keinen Einfluß fanden FOOTE und THIBAUT (1969). NEWCOMB et al. (1978) erzielten gute Reifungsergebnisse mit einem Medium, dem $17\text{-}\beta$ Östradiol zugesetzt war. Nach Transfer der in vitro gereiften Oozyten in inseminierte Empfänger beobachteten sie bei 38 % der übertragenen und wiedergewonnenen Oozyten eine Weiterentwicklung, wobei aus 2 abermals übertragenen Blastozysten normale Kälber geboren wurden. In Anlehnung an die positiven Ergebnisse beim Schaf (STAIG-MILLER und MOOR, 1984) erfolgte auch in den jüngsten Experimenten mit Granulosa-Cokultur eine Zugabe von $17\text{-}\beta$ Östradiol (CRITSER et al., 1986).

Elektrolyte wie Ca^{++} und Mg^{++} erwiesen sich als notwendige Bestandteile der Kulturmedien zur Reifung von Rinderoozyten (LEIBFRIED und FIRST, 1979 a; MARUSKA et al., 1984).

Als Proteinquelle diente bei der Mehrzahl der Experimente hitzeinaktiviertes foetales Kälberserum (FCS - Fetal Calf Serum), aber auch Bovines Serum Albumin (BSA) wurde in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (Tabelle 1).

Der Zyklusstand der Ovarien, von denen unreife Oozyten gewonnen wurden, und die Größe der punktierten Follikel hatten keinen Einfluß auf die Reifungsrate, wohingegen ein unversehrter kompakter Cumulus oophorus

eine wichtige Voraussetzung für eine hohe Reifungsrate war (LEIBFRIED und FIRST, 1979 b; FUKUI und SAKUMA, 1980).

Die optimale Inkubationstemperatur auch in Bezug auf die spätere Fertilisation lag beim Rind bei 39°C , was auch der Kerntemperatur dieser Spezies entspricht (LENZ et al., 1983 a). Der Großteil der Experimente wurde jedoch in Anlehnung an Experimente bei anderen Spezies bei 37°C durchgeführt (Tabelle 1).

Unter den beschriebenen Bedingungen einer Vielzahl der Experimente mit Rinderoozyten konnte eine gute Kernreifungsrate erzielt werden, jedoch war eine Weiterentwicklung nach Fertilisationsexperimenten in vivo oder in vitro nur äußerst selten (TROUNSON et al., 1977; NEWCOMB et al., 1978). Durch Experimente beim Schaf konnte gezeigt werden, daß der Einfluß von follikulären Strukturen unerläßlich für eine vollständige in vitro Reifung von Oozyten ist (MOOR und TROUNSON, 1977; STAIGMILLER und MOOR, 1984). Durch eine Cokultur von Oozyten mit Granulosazellen konnten auch beim Rind die Reifungsbedingungen verbessert werden. Im Gegensatz zum herkömmlichen Reifungssystem in einem Zellkulturmedium, bei dem nach in vitro Fertilisation und in vivo Kultur keine Weiterentwicklung beobachtet werden konnte, entwickelten sich in Cokultur gereifte Oozyten zu einem hohen Prozentsatz zu Morulae und Blastozysten (36 %). Eine erste Trächtigkeit zeigt, daß Oozyten durch dieses Cokultursystem vollständig in vitro gereift werden können (CRITSER et al., 1986).

Tabelle 1: Literaturübersicht zur in vitro Reifung von Rinderoozyten

Autoren	Inkubationsbedingungen für die Oozytenreifung	untersuchte Faktoren	Beurteilung	Ergebnisse (n)
BALL et al., 1983	mod. Tyrode's Medium - 10 % FCS 24 h, 39 °C, 5 % CO ₂	Einfluß von: FSH C-AMP Cumulus auf Kernreifung IVF	Fixierung/Färbung Penetrationsrate	ohne Zusätze: 38 % (68) Penetr. FSH : 50 % (60) " C-AMP : 64 % (62) " mit Cumulus 79 % (53) Vorkern ohne " 32 % (53)
BREGULLA et al., 1974	- TCM 199 - Ringer-Lösung 10 % FCS 24 - 48 h, 37 °C Medium CO ₂ gesättigt	Kernreifung IVF Weiterentwicklung	Nativ: Polkörperchen Teilungsraten	(1977) 12x1 Polkörperch. 1x T 13x2 " 1x T 3x>2 " 2x T 1x T 9
CHURCH et al., 1974	1. BMOC - 3 2. Synthetic oviduct fluid 3. TCM 199 + BSA (3 mg/ml) 4. BMOC - 3 + BSA (12 mg/ml) 24 h, 5 % CO ₂	Einfluß: A: Verschiedener Medien auf Kernreifung B: Chromosomenabnormalitäten	Chromosomenanalyse	A: 1: 54 % M II 2: 37 % " 3: 64 % " 4: 76 % " B: Keine Häufung von Chromosomenabnormalitäten nach in-vitro Reifung
GRITSER et al., 1966	TCM-199 10 % FCS	Einfluß von: Granulosazellen auf A: Kernreifung B: IVF C: Weiterentwicklung	Fixierung/Färbung Teilungsraten nach in-vivo Kultur	A: 70 % M II (197) B: 87 % Fertilisation (38) C: 94 % O + Vorkerne (33) 36 % Morulae u. Blastozysten (22)
EDWARDS, 1965	- Waymouth's Medium - TCM 199 - Hank's Saline 10 % Serum 5 % CO ₂	Kernreifung	Fixierung/Färbung	nach 31 h 100 % M II (14)

Fortsetzung zu Tabelle 1

FUKUI und SAKUMA, 1980	TCM 199 BSA (3 mg/ml) 24-33 h, 37-38 °C, 5 % CO ₂	Einfluß von: A: Cumulus B: Zyklusstand auf Kernreifung	Fixierung/Färbung	A mit Cumulus 60 % MII (195) ohne Cumulus 18,5 % B Corpus luteum 49,6 % MII (260) " albicans 45,9 % (225)
FUKUI et al., 1983	Ham's F-12 20 % FCS 24 h/48 h	Kernreifung Fertilisation im kanincheneiweiter Kapazitierung	Fixierung/Färbung Penetrationsrate Teilungsrate	24 h Reifung 63 % Fertilisation 17 % Polyspermie 10 % (533)
FULKA et al., 1982	TCM 199 Kälberserum-Protein (30 mg/100 ml) 22-24 h, 37,5 °C, 5 % CO ₂	Kernreifung IVF ohne Zona	Fixierung/Färbung	84 % MII (96) nur ca. 50 % bilden nach IVF den " Vorkern aus
HENSLEIGH und HUNTER, 1985	MEM 10 % FCS 48 h, 37 °C, 5 % CO ₂	Einfluß von: A: FSH B: HCG auf Kernreifung IVF	Expansion Mochayer-Bildung Teilungsrate nach IVF	A 56 % Expansion B 39 % je 5 Oozyten fertilisiert 15 % Teilung (180) Einzelferti- lisation 5 % (102)
HUNTER et al., 1972	Tyrode's Medium homologe Follikelflüssigkeit BSA 1 g/l 37 °C, 5 % CO ₂	Kernreifung Fertilisation in-vivo (Rind)	Fixierung/Färbung Vorkernausbildung	86,8 % MII (53) 20% Vorkernausbildung (55)
IRITANI et al., 1984	Krebs-Ringer Lösung BSA (4 mg/ml) 28 h, 37 °C, 5 % CO ₂	Kernreifung IVF Spermienkapazita- tion in A: Medium B: isoliertem Schweineuterus	Fixierung/Färbung	78,6 % (68-90 %) MII (644) Fertilisation A 58 % B 86 % (81) (55)

Fortsetzung zu Tabelle 1

JAGIELLO et al., 1974	Diploid Medium 12 % Schafserum 8 - 26 h	Chiasmatafrequenz	Cytologische Untersuchung	Mittlere Chiasma Frequenz 1,19/Bivalent
JESCH et al., 1975	Kanincheneileiter in-vivo 6 - 30 h	Kernreifung durch in-vivo Kultur	Fixierung/Färbung	Anteil gereifter Oozyten nimmt zu mit zunehmender Inkubationsdauer höchster Prozentsatz 49 %
KRUIP und VERNOOY, 1981	extra folliculär: Hams's F 12 BSA (1 %) 24 h, 5 % CO ₂ , 4-37 °C intrafollikulär: TCM 199 24 h, 5 % CO ₂ , 40 % N ₂ , 4-37 °C	Temperatureinfluß auf Kernreifung Vergleich: A extrafollikuläre B intrafollikuläre Kulturen	Fixierung/Färbung	keine Reifung zwischen 4 °C und 30 °C, ab 26 °C bei allen Oozyten GVB A 37 °C 64,8 % M I + II (91) B 37 °C 50 % M I + II (8)
LEIBFRIED und FIRST, 1979	TCM 199 Earle's Salt Solution 15 % Rinderserum 24 - 26 h, 37 °C, 5 % CO ₂	Einfluß von: A Zyklusstand des Ovars B Eizellqualität C Follikelgröße D Cumulus	Fixierung/Färbung	A kein Einfluß B schlechte Qualität ist korreliert mit niedrigen Reifungsraten C kein Einfluß D deutlich positiver Einfluß durch intakten Cumulus
LEIBFRIED und FIRST, 1979	Eagle's Medium 10 % FCS 24 - 26 h, 37 °C, 5 % CO ₂	Einfluß von: Ca ⁺⁺ /Mg ⁺⁺ auf Kernreifung	Fixierung/Färbung	Ca ⁺⁺ / -Mg ⁺⁺ 9,2 % M II (162) +Ca ⁺⁺ / +Mg ⁺⁺ 63,0 % " (164)

Fortsetzung zu Tabelle 1

LENZ et al., 1983	mod. Tyrode's Medium 10 % FCS 24 h, 5 % CO ₂ 35 ° C, 37 ° C, 39 ° C, 41 ° C	Temperatureinflus auf Kernreifung und IVF	Fixierung/Färbung	Reifung
				35 ° 75 % M II (52) 37 ° 69 % " (62) 39 ° 66 % " (64) 41 ° 19 % " (67) Beste IVF Ergebnisse (%): Penetration versch. Temp.: 39 ° C 53 % (53) (Reifung bei 39 ° C) Reifung versch. Temp.: 39 ° C 58 % (67) (Penetration bei 39 ° C)
MARUSKA et al., 1984	- TCM 199 Earle's Salze - Earle's Basis Medium 10 % FCS 24 - 26 h, 37 ° C, 5 % CO ₂	Einfluß von: ++ Ca und Calcium- Calmodulin auf A Meiose- B Cumulus- C Cumulus- D Überlebensrate Hyaluronidase- sensibilität	Fixierung/Färbung	++ Ca Mangel und Hemmung des Calcium-Calmodulinkomplexes haben einen negativen Einfluß auf A und C; B wird erst durch extrem hohe Dosis des Hemmstoffes beein- trächtigt, D bei expandiertem Cumulus unbeeinflusst.
MOTLIK et al., 1978	TCM 199 Kälber-Serumprotein (30 mg/ml) bis 24 h, 38 ° C, 5 % CO ₂	zeitlicher Ablauf des GVB	Fixierung/Färbung	5 h Kultur: 30,4 % Oozyten vollend. GVB 6 h Kultur: 92,5 % Oozyten vollend. GVB

Fortsetzung zu Tabelle 1

NEWCOMB et al., 1976	Ham's F 10 20 % Rinderserum 22 h, 37° C, 5 % CO ₂	Kernreifung Fertilisierbarkeit in-vivo Weiterentwicklung	Fixierung/Färbung Teilungsrate	92,3 % M II (39) 9 T, 6 T, 6 Morulae 2-4 8-16 2 Blastozysten: Übertragen: 2 Kälber (60)
SANBUISSHO und THRELFALL, 1985	Ham's F 10 Rinderserum 26 - 28 h, 38,5° C, 5 % CO ₂ , 5 % O ₂ , 90 % N ₂	Einfluß von: Serum von Rindern verschiedener Zyklusstadien auf A kernreifung B IVF	Nativ: Polkörper- chen Teilungs- raten in-vitro	A (Östrus-Serum) 53,4 % Polkörper- (144) B (") 33,9 % Fertilis- (56) 6 T, 1 T, 1 T 4, 8, 16
SATO et al., 1977	Krebs-Ringer Lösung BSA (1 mg/ml) 24 h, 37° C, 5 % CO ₂	Einfluß der Energiequelle auf Kernreifung	Fixierung/Färbung	Geeignete Energiequellen: M II Glucose-1-phosphat 81,8 % (11) Glucose-6-phosphat 43,8 % (16) Phosphoenolpyruvat 40,0 % (10) Pyruvat 58,3 % (12) Oxalacetat 50,0 % (18) Ungeeignet: Lactat, Malat, Fumarat, Citrat (5,9-9,1 % M II)
SHEA et al., 1976	Ham's F 10 10 % FCS 0 - 36 h, 37° C, 5 % CO ₂	Einfluß von: A Punktionszeitpkt. 1 Inkubationsdauer B C pH 1 auf Kernreifung Fertilisation in: A Schweineeileiter B Schafeileiter 2	Fixierung/Färbung	A kein Einfluß 1 1 h p.m. 78 % M II, 2 2 h p.m. 72 % M II, 8 28 h optimale Inkubations- 1 dauer (60 % M II) C Reifung zw. pH 6,70 und 7,59 1 Optimum pH 7,00-7,29 (69 % M II) A 17 % Penetration 2 B keine Penetration 2

Fortsetzung zu Tabelle 1

SREENAN, 1970	- Rinderfollikelflüssigkeit - "growth medium" 27 - 32 h, 37 °C	Einfluß von: Medien auf Kernreifung Vergleich Fertilisation A Kanincheneileiter B Schaf-eileiter C IVF	Fixierung/Färbung Teilungsrate	Growth Medium 74,5 % M II (100) Follikelflüssigkeit, 34,6 % M II A: keine Fertilisation (103) B: 15 % Fertilisation Teilungen bis T ₈ C: keine Fertilisation
SUSS und WÜTHRICH, 1985	TCM 199 20 - 24 h, 38 °C, Luft	zeitlicher Ablauf der Meiose	Chomosenanalyse	nach 14 - 16 h 87 % Diakinese 72 % M II (312) bei Punktion intakter OV nur in Oozyten "ohne Reifungspotenz"
TROUNSON et al., 1977	FCS 1, 37 °C, 5% CO ₂ , 5% O ₂ , 90% N ₂ 2, 37 °C, 5% CO ₂ , Luft 3, 37 °C, Luft 48 h/72 h	Einfluß von: A Inkubationsdauer B Inkubationsbe- dingungen auf Kernreifung Fertilisation C im Kaninchen- eileiter D im Rindereileiter E von Oozyten ver- schiedener Reifung	Fixierung/Färbung	A nach 48 h keine Steigerung der Meiosesterate durch längere In- kubation B 2, 65 % M II kein signifikanter C keine Penetration D 48,8 % Penetration (45) Entwicklung bis zur Blastozyste (2) E Reifung in-vitro: 2 von 17 normale Entw. Intrafollikulär/ in-vitro : 28 von 83 norm. Entw. in-vivo/ ovuliert: 4 von 7 norm. Entw.

2.4 In vitro Fertilisation (IVF) beim Rind

2.4.1 Geschichte

Versuche, Säugetiereizellen in vitro zu fertilisieren wurden in der ersten Hälfte dieses Jahrhunderts bei einer Reihe von Versuchs- und Nutztieren durchgeführt. Nachdruck erhielten diese Experimente 1959 durch einen Bericht von CHANG, dem es erstmals gelungen war, durch das Zusammenbringen von tubalen Eizellen mit Sperma, das aus dem Uterus anderer Kaninchen gewonnen wurde, lebende Nachkommen zu produzieren. Die aus der IVF hervorgehenden Zygoten kultivierte er bis zum 4-Zell Stadium und übertrug sie anschließend auf hormonal synchrone Empfänger-tiere. Changs Experimente verdeutlichten, daß Spermien vor der Fertilisation (in vitro oder in vivo) kapazitiert werden müssen. Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen beschäftigt sich seither mit der in vitro Fertilisation. Heute sind erste Schritte der IVF bei fast 20 Säugetier-spezies geglückt.

Erste Berichte über normale Nachkommen aus IVF existieren von Kaninchen (CHANG, 1959), Maus (WHITTINGHAM, 1968), Ratte (TOYODA und CHANG, 1974), Mensch (ŠTEPTOE und EDWARDS, 1978), Rind (BRACKETT et al., 1982 a) und Schwein (CHENG und POLGE, 1983). 1986 wurde erstmals über die Geburt von Schafen aus in vitro gereiften Oozyten und IVF berichtet (CHENG et al., 1986).

2.4.2 Grundlagenforschung

Einen umfassenden Überblick über die in vitro Fertilisation beim Rind gibt BRACKETT (1983).

Vor 1970 wurden Befruchtung und frühe Embryonalstadien beim Rind nur lichtmikroskopisch untersucht. Darauf folgten elektronenmikroskopische Untersuchungen vor allem an follikulären Rinderoozyten. Viele Experimente zielten auf die in vitro Reifung von Rinderoozyten ab (siehe 2.3). Es folgten Bestrebungen, Rindereizellen in vitro zu fertilisieren (BREGULLA et al., 1974; IRITANI und NIWA, 1977; BRACKETT et al., 1978).

Eine ultrastrukturelle Untersuchung der Fertilisation beim Rind zeigte die Abwesenheit cortikaler Granula als Charakteristikum für die Fertilisation und Entwicklung vor der Implantation. Die Auflösung der cortikalen Granula wird, wie auch bei anderen Spezies, durch die Spermienpenetration und Eizellenaktivierung initiiert. Die IVF-Experimente waren zunächst verwirrend, da bei einigen Eizellen, die lichtmikroskopisch fertilisiert erschienen, die cortikalen Granula nicht verschwanden. Jedoch war es trotz dieser Tatsache möglich elektronenmikroskopisch die IVF beim Rind nachzuweisen (BRACKETT et al., 1980). Spermienreste wurden sowohl in Zygoten als auch gelegentlich im Blastomerenzytoplasma von 2-Zellern gefunden. Polyspermie wurde in vivo äußerst selten beobachtet (MEINEKE-TILLMANN und MEINECKE, 1980).

Vor der Fertilisation treten an den Spermien einige Veränderungen auf, ohne die eine normale Befruchtung nicht möglich zu sein scheint. Die Ca-Aufnahme des Bullenspermas ist offensichtlich der Verknüpfungspunkt zwischen Membranveränderungen und der Aktivierung der Spermienmotilität bzw. der Akrosomenreaktion. Ein Glycoprotein-Inhibitor mit reversibler Kapazitations- und akrosomenstabilisierender Aktivität muß im Zuge des Kapazitationsprozesses entfernt werden, um die kalziumabhängigen Membranveränderungen der Akrosomenreaktion zu ermöglichen. Wie durch Modellversuche am Kaninchen gezeigt werden konnte, wird dieser Prozess in vitro durch die Behandlung des Spermas mit einem Medium erhöhter Ionizität (HJS) ausgelöst. Die darausfolgenden IVF Experimente führten bei einem geringen Anteil der Embryonen zur Entwicklung normaler Nachkommen (BRACKETT und OLIPHANT, 1975). Durch Verwendung von Cauda-Epididymidis-Sperma konnten diese Ergebnisse noch weiter verbessert werden. Eine zusätzliche Inkubation des Spermas ermöglichte die Spermienpenetration innerhalb von 3,5 h nach Insemination, Werte, die auch bei Verwendung von in vivo kapazitiertem Sperma vorkommen. In jüngeren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß eine Annäherung von in vitro Kapazitation und Fertilisation an in vivo Prozesse durch eine zusätzliche 17stündige Präinkubation nach HJS-Behandlung möglich war (BRACKETT et al., 1982 b).

2.4.3 Oozyten-Reifung und in vitro Fertilisation

Fragmentation, verzögerte Entwicklung und abnormale Entwicklung sind nach angestrebter Fertilisation unreifer Oozyten oder Oozyten, die durch Kultur in vitro gereift wurden, häufig (BREGULLA et al., 1974;

TROUNSON et al., 1977; MOOR und WARNES, 1978). Polyspermie, verursacht durch inadäquate Auflösung der corticalen Granula steht im Zusammenhang mit der Unreife der Oozyten zum Zeitpunkt der Insemination.

So führte zum Beispiel die um 30 min. verzögerte Insemination (5 1/2 statt 5 h nach Punktion) humaner Eizellen zu einem deutlichen Anstieg der Fertilisations- und Entwicklungsrate (TROUNSON et al., 1982). Eine ähnliche Erklärung könnte für Rinderoozyten zutreffen, die noch corticale Granula aufwiesen (BRACKETT et al., 1980). Dies könnte auch eine Erklärung für eine in vitro auftretende Polyspermie bei Rindereizellen sein.

In einem Experiment von FULKA et al., 1982, wurden Rinderoozyten von 3-5 mm großen Follikeln gewonnen, in modifiziertem Medium 199 22-24 h gereift. Vor der in vitro Insemination wurde enzymatisch die Zona pellucida entfernt. Sperma aus der Cauda epididymidis wurde 5-6 h in einem Medium mit hohem BSA-Anteil (20 mg/ml) inkubiert und zonafreie Oozyten und Tropfen der Spermiesuspension 12-14 h kokultiviert. 84 % der Oozyten reiften zur Metaphase II. Bei der Untersuchung auf Penetration und Vorkernentwicklung waren fast alle Oozyten penetriert, davon etwa 50 % mit mehr als einem Spermium. 261 (51,1 %) Eizellen wiesen die Entwicklung beider Vorkerne auf, 249 (49,9 %) nur einen (weiblichen) Pronucleus. Die Autoren schlossen daraus, daß eine Substanz, die für die Ausbildung des männlichen Vorkerns verantwortlich ist, in ca. 50 % der Oozyten vorhanden ist.

Weitere interessante Experimente orientierten sich an den Untersuchungen, die zuvor bei Hamstern durchgeführt wurden.

Rinderoozyten mit Cumuluszellen wurden von 1-5 mm großen Follikeln gewonnen, 24-48 h kultiviert und weitere 24-28 h mit epididymalem Sperma inkubiert. Das Basismedium bestand aus Tyrodes Medium, Albumin, Lactat und Pyruvat (BALL et al., 1983). Für die Reifung erfolgte ein Zusatz von FSH oder eine 6 stündige Behandlung mit c-AMP.

Epididymales Sperma wurde in einer weiteren Abwandlung des TALP-Medium (versetzt mit Hepes-Puffer) bei pH 7,3 - 7,4 gewaschen. Das TALP-Medium, das für die in vitro Insemination Anwendung fand, enthielt Epinephrin (1 μ M) und Hypotaurin (10 μ M).

Diese Komponenten sind geeignet, Hamstersperma adäquat für die Eipenetration zu kapazitieren und kommen natürlicherweise im Eileiter vor (LEIBFRIED und BAVISTER, 1982).

Nach Hinzufügen von FSH oder c-AMP zum Reifungsmedium wurde die Penetration verbessert. Auch das Vorhandensein von Cumuluszellen wirkte sich positiv aus. Jedoch wurde ein hoher Anteil an Polyspermie (9 %) beobachtet. In den erfolgreichsten Experimenten traten bei 27 (41,9 %) von 64 Eizellen männlicher und weiblicher Vorkern auf. Unter Verwendung des gleichen Basismediums zur Inkubation des Spermias wurde der Einfluß von Glucosaminoglycanen auf die Akrosomenreaktion untersucht (LENZ et al., 1983 b). Die Zugabe von Chondroitinsulfat erhöhte das Eintreten der Akrosomenreaktion signifikant. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß Glucosaminoglycane in Fortpflanzungsorganen für einige der biochemischen Veränderungen, die mit der Fertilisation einhergehen, verantwortlich sind.

Temperatureinflüsse auf Oozyten-Reifung, Akrosomenreaktion von Rinderspermien und Hyaluronsäureproduktion der Cumuluszellen in vitro untersuchten ebenfalls BALL et al., 1983. Die für die Akrosomenreaktion optimale Temperatur lag bei 38° C, während bei 39° C gereifte Oozyten mit einer Penetration von 53 % eine deutlich höhere Fertilisationsrate als Vergleichsgruppen aufwiesen. Daraus folgt, daß Vorgänge, die sich vor der Fertilisation abspielen, temperaturempfindlich sind.

IRITANI et al., 1984, verwendeten für ihre Versuche Rinderoozyten, die sie 28 h in modifiziertem KBR-Medium inkubierten. Nach 4-4,5 stündiger Praeinkubation des verwendeten Spermias in Uteri von brünstigen Rindern oder Schweinen traten Fertilisationsraten von 80 - 86 % auf, bei einer Polyspermierate von 13 % bzw. 24 %, wohingegen bei einer Präinkubation in vitro in modifiziertem KBR Medium, einer optimalen Zeitdauer von 8 h und einer Fertilisationsrate von nur 40 % keine Polyspermie auftrat.

Eine deutliche Verbesserung der Fertilisationsraten konnte durch eine Präinkubation der Spermien in einem heparinisierten Medium (10 ug/ml) erzielt werden (PARRISH et al., 1985). Dabei kam es mit zunehmender Präinkubationsdauer (bis max. 6 h) zu einem linearen Anstieg der Fertilisationsraten und der Akrosomenreaktion. Eine Beeinträchtigung der Spermienqualität bzw. ein Anstieg der Polyspermierate wurde hierbei nicht beobachtet. Die selbe Arbeitsgruppe entwickelte ein Verfahren zur Verwendung von Tiefgefrier-Sperma bei der IVF, wobei es sich im Prinzip um ein Anreicherungsverfahren motiler Spermien handelt - die

sog. Sperm-swim-up-procedure. Durch Kombination dieser IVF Methoden mit einer Oozytenreifung in Cokultur mit Granulosazellen konnten erste Trächtigkeiten erzielt werden (CRITSER et al., 1986).

2.4.4 Normale Entwicklung nach in vitro Fertilisation beim Rind

Die Spermienpenetration (19-24 h nach Insemination beobachtet) vollzog sich bevorzugt bei Oozyten, die nahe dem induzierten Ovulationszeitpunkt von Follikeln oder aus dem Eileiter gewonnen wurden, verglichen mit solchen, die aus 2-5 mm großen Follikeln gewonnen und vor der Insemination 18-25 h lang gereift wurden. Dies läßt vermuten, daß Faktoren, die die Spermienpenetration beeinflussen, an die Oozyten gebunden sind. In Experimenten mit 6 verschiedenen Bullen wurden Unterschiede in den Befruchtungsergebnissen beobachtet. Trotz der Samenunterschiede verschiedener Tiere gelang es, eine wiederholbare Methode der IVF von Rinderoozyten zu entwickeln (BRACKETT et al., 1982 a). Diese beinhaltet die Gewinnung von Oozyten nahe dem Zeitpunkt der Ovulation, nach einer Behandlung der Spender mit Pregnant Mares Serum Gonadotropin (PMSG) und Prostaglandin F_2 . Zur in vitro Kapazitation wurde das Spermia zunächst inkubiert, dann mit HJS-Medium behandelt und danach vor der Insemination in einem weiteren Medium inkubiert. In einem Experiment wurde auch gefrorenes Spermia erfolgreich angewendet.

In einer Serie, in der 4 verschiedene Bullen verwendet wurden, konnten 34 (43,6 %) von 78 tubulären Eizellen und 13 (19 %) von 66 follikulären Eizellen in vitro fertilisiert werden. Mit dem Spermia eines dieser Bullen lag die Fertilisationsrate bei 62,9 % (22 von 35 tubulären Eizellen). Starke Vorwärtsbeweglichkeit und die Unversehrtheit des Akrosoms erwiesen sich als wichtige Kriterien guter Spermaproben für die Penetration (ebenda). Die in vitro Entwicklung reichte bis zum 8-Zell-Stadium. In einem Experiment wurde ein 4-Zell Embryo in eine synchronisierte Empfängerkuh übertragen, die am 9. Juni 1981 ein männliches Kalb zur Welt brachte. Der Beweis der Elternschaft wurde durch Blutgruppenbestimmung erbracht. Das erste Kalb aus IVF war völlig normal entwickelt (BRACKETT et al., 1982 a).

Mittlerweile mehren sich die Berichte über geglückte in vitro Fertilisation beim Rind (BRACKETT et al., 1984; SIRARD und LAMBERT, 1985; CRITSER et al., 1986; LAMBERT et al., 1986; LEIBFRIED-RUTLEDGE, 1986).

2.5 Vorkerndarstellung bei lebenden Zygoten

In Zygoten von Maus und Kaninchen sind die beiden Vorkerne bei mikroskopischer Betrachtung deutlich zu erkennen. Im Gegensatz dazu sind die Vorkerne beim Rind von dichten Dottermassen überlagert, so daß sie nativ nicht im Zytoplasma der Zygote zu erkennen sind.

Die gängigste Methode, Vorkerne beim Rind darzustellen, ist die Fixierung als Quetschpräparat in Äthanol/Eisessig und eine Färbung mit Kernfarbstoffen wie z.B. Orceinrot (siehe Tabelle 1).

Für einige Bereiche der Mikromanipulation ist jedoch die Grundvoraussetzung, Vorkerne in den lebenden Zygoten darzustellen, ohne dabei die Überlebensfähigkeit und Weiterentwicklung der Embryonen zu beeinträchtigen. Über eine gelungene Vorkerndarstellung beim Rind existieren bislang nur wenige Berichte. Bei diesen ist zwischen einer Darstellung mittels Fluoreszenzfarbstoff und einer Darstellung durch Zentrifugation zu unterscheiden.

2.5.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde bei Embryonen zunächst zur Verbesserung der Beurteilungskriterien herangezogen. SCHILLING und DOEPEKE (1978) beschrieben eine Methode, Qualität und Lebensfähigkeit von Kaninchen- und Rinderembryonen mit Hilfe des Lebendfarbstoffes 3',6'-Diacetyl-Fluorescein zu erfassen. Diese nichtfluoreszierende Substanz wird nach Kontakt mit Hydrolasen lebender Zellen fluoreszierend. Mit diesem Farbstoff gelang es allerdings nicht, gezielt Kernstrukturen nachzuweisen. Hierzu ist ein Farbstoff mit einer hohen Affinität zu spezifischen Kernstrukturen, wie den Nucleinsäuren nötig.

4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) weist durch seine spezifische Affinität zur DNA diese Eigenschaften auf. Dieser Farbstoff wurde zunächst wiederum zur Beurteilung von Embryonen verwendet (SCHILLING et al., 1979).

MINHAS et al. (1984) berichteten erstmals von der Darstellung von Vor-

kernen mit Hilfe der DAPI-Fluoreszenz. Die verwendete Farbstoffkonzentration betrug dabei 0,01 mg/ml. Bei 39 Zygoten, in denen beide Vorkerne nachgewiesen werden konnten, konnte in vitro keine Weiterentwicklung beobachtet werden. 2 von 7 2-Zellern, die gefärbt worden waren, teilten sich in Kultur einmal, wobei die Kerne dieser 4-Zeller normal entwickelt waren.

CRITSER et al. (1983) berichteten von der Verwendung des Farbstoffes Hoechst 33342 zur Darstellung von Kernmaterial in frühen Rinderembryonen. Hierbei konnte zwar eine Weiterentwicklung beobachtet werden, jedoch scheint die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen die Überlebensrate von Embryonen erheblich zu beeinträchtigen. Möglicherweise ist die Einwirkung ultravioletter Strahlung für die Schädigung der Embryonen verantwortlich (WALL et al., 1985).

2.5.2 Zentrifugation

Die Zentrifugation ist eine seit langem probate Methode, um bei Eizellen von Seeigeln zytoplasmatische Bestandteile voneinander zu trennen und dadurch die Kerne darzustellen (WALL et al., 1985).

Aufbauend auf diesen Erfahrungen wurden Versuche unternommen, auch bei Zygoten von Haussäugetieren durch Zentrifugation die Vorkerne darzustellen.

NANCARROW et al. (1984) zentrifugierten Zygoten von Schafen und Rindern 1 Minute lang bei 12.000 g. Während bei den Eizellen von Schafen keine Auftrennung des Zytoplasmas erreicht werden konnte, lagerten sich bei den Rinderzygoten die Lipidgranula an den Rand der Zelle. Die Vorkerne wurden dadurch sichtbar.

Diese Beobachtungen wurden von WALL et al. (1985) bestätigt. In diesen Versuchen erfolgte die Zentrifugation ebenfalls 3 min. bei ca. 15.000 g. In umfangreicheren Untersuchungen mit Zygoten und 2-Zellern von Schweinen konnte im Vergleich zu Kontrollembryonen kein Unterschied in der Weiterentwicklung festgestellt werden. Ähnliche Beobachtungen machte VOGEL (1985).

LOSKUTOFF et al. (1986) gelang es durch Zentrifugation (3 min., 15.000 g) bei 72 Zygoten und 17 Zweizellern, die durch chirurgische Eileiterspülung von Rindern gewonnen wurden, die Vorkerne bzw. Kerne darzustellen. Nach Mikroinjektion und Zwischenkultur erfolgte der Transfer von Embryonen unterschiedlicher Stadien auf 24 Empfängertiere, von denen bei drei Tieren eine Trächtigkeit diagnostiziert wurde.

Die o.g. Autoren folgerten daraus, daß die Zentrifugation eine geeignete Methode sei, um die Vorkerne bei Rind und Schwein darzustellen, ohne die Embryonen merklich zu schädigen.

In vivo Kulturversuche zeigten jedoch, daß beim Schwein die Überlebensrate der Embryonen nach Zentrifugation reduziert ist (SPRINGMANN und BREM, 1986).

2.6 Kultur von Rinderembryonen

Die ersten Versuche, Säugetierembryonen in vitro zu kultivieren wurden 1880 von SCHENK unternommen. Es folgten zahlreiche Experimente auf diesem Gebiet, wobei die meisten Erfolge bei Maus und Kaninchen erzielt wurden (zur Übersicht siehe BRINSTER; 1968).

HAMMOND (1949) gelang es als erstem, Mäuseembryonen in einer Salzlösung, die mit Glucose und Hühnereiklar angereichert war, über mehrere Teilungsstadien zu kultivieren. WHITTEN (1956) kultivierte 8-Zell-Embryonen von Mäusen bis zur Blastozyste, wobei 90 % der Embryonen dieses Stadium erreichten.

Wesentlich schwieriger gestaltete sich die Kultur von Embryonen der Haussäugetiere. Hier wird nur das Rind genannt.

PINCUS beobachtet bereits 1951, daß sich Rinderembryonen in vitro bis zu 40 h weiterentwickelten (zitiert nach BRINSTER; 1968). BROCK und ROWSON (1952) beschrieben, daß 4-Zeller sich in homologem Serum bis zu 8-Zellern entwickelten, in Follikelflüssigkeit dagegen konnte keine Teilung beobachtet werden. BRINSTER (1968) gelang es, Zweizeller in einem Kulturmedium (BMO2) bis zu einem Stadium mit 9-12 Blastomeren zu kultivieren.

Bereits die ersten Versuche, Rinderembryonen zu kultivieren, haben erwiesen, daß sich bei dieser Spezies vor allem die Kultur früher Embryonalstadien als sehr schwierig erweist. Hierbei kommt es nach einigen Teilungen in einem bestimmten Stadium zu einer Hemmung der Weiterentwicklung. Zahlreiche Untersuchungen kommen hier zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Eine umfangreiche Übersicht liegt hierzu von WRIGHT und BONDOLI (1981) vor.

Diese Entwicklungshemmung konnte in späteren Untersuchungen näher beschrieben werden. EYESTONE und FIRST (1986) stellten an Hand vergleichender Untersuchungen fest, daß es sich hierbei um eine spezifische Hemmung des 8-Zell-Stadiums handelt, die sobald sie eingetreten ist, trotz Veränderung der Kulturbedingungen, irreversibel erscheint.

Allerdings beschrieben WRIGHT et al. (1976), daß bei Kultur von Rinderembryonen in Ham's F10 Medium mit foetalem Kälberserum als Proteinquelle diese Hemmung nicht zum Tragen kam und 2-8 Zeller sich in vitro bis zu Blastozysten entwickelten.

Rinderembryonen, die in vivo bereits Teilungen über das 8-Zellstadium hinaus vollzogen haben, können dagegen in vitro bis zum Blastozystenstadium kultiviert werden (KANAGAWA, 1979). MASSEY et al. (1982) konnten durch Entfernung der Zona pellucida keinen negativen Einfluß auf die Entwicklung der Embryonen in Kultur feststellen. Eine intakte Zona ist jedoch bei frühen Embryonen eine der Voraussetzungen eines erfolgreichen Transfers. Auch in diesen Experimenten war das Alter der Embryonen zu Kulturbeginn entscheidend für die Überlebensdauer in vitro.

CAMOUS et al. (1984) gelang es durch Cokultur früher Embryonen zusammen mit Trophoblastvesikeln (Tag 13-14 Embryonen) die 8-Zellhemmung zu überwinden. Es wird hier jedoch angenommen, daß durch Einwirkung der Trophoblasten das Phänomen der Hemmung nicht auftritt.

In den IVF-Experimenten von LAMBERT et al. (1986) entwickelten sich zwar 4,5 % der fertilisierten Oozyten in vitro zu 16-Zellern, jedoch konnte nach Transfer dieser Embryonen keine Trächtigkeit registriert werden.

Die Ergebnisse der in vitro Kultur von Tag 4-5 Embryonen konnte durch Cokultur mit Rinderfibroblasten verbessert werden, vor allem was das Schlüpfen der Blastozysten anbelangt (KUZAN und WRIGHT, 1981).

Da sich die Kultur früher Rinderembryonen durch das Phänomen der 8-Zellhemmung als sehr schwierig erwies, diese jedoch zur Klärung zahlreicher Fragen bezüglich der frühen Embryonalentwicklung von großer Bedeutung wäre, wählten einige Arbeitsgruppen den Umweg einer Zwischenkultur in einem lebenden System. Zunächst war die heterologe in vivo Kultur für das Schaf beschrieben worden (LAWSON et al., 1972).

Schaf und Kaninchen erwiesen sich als geeignete Zwischenempfänger für Rinderembryonen. In beiden Tierarten ist die Kultur bis zum Blastozystenstadium geglückt (SHEA et al., 1976; TROUNSON et al., 1977; WILLADSEN et al., 1981; FUKUI et al., 1983; CRITSER et al., 1986; LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1986; EYESTONE und FIRST, 1986).

3. MATERIAL UND METHODE

3.1 Gewinnung der Oozyten

Die Ovarien für die Gewinnung von Oozyten und Follikeln wurden an den Schlachthöfen von München und Starnberg gewonnen. Der Zeitraum von der Tötung der Tiere bis zur Entnahme der Proben betrug etwa 10 min. Bei den Tieren handelte es sich fast ausschließlich um solche der Rasse Deutsches Fleckvieh. Zur Verwendung kamen die Eierstöcke sowohl von Kühen als auch von Färsen, wobei atretische, zystös veränderte und solche von graviden Tieren nicht verwendet wurden.

Der Transport ins Labor erfolgte in Thermosgefäßen in isotonischer Kochsalzlösung, bei einer Temperatur zwischen 25° und 30° C.

Die Punktion und weitere Behandlung der Oozyten im Labor dauerte ca 1,5 h, so daß zwischen Entnahme der Ovarien und Inkubation der Oozyten je nach Verfügbarkeit weiblicher Schlachtrinder zwischen 2 und 4 h vergingen.

Zur Gewinnung der Oozyten wurden alle auf der Oberfläche eines Ovars sichtbaren Follikel einer Größe zwischen 2 und 5 mm Durchmesser punktiert und die Follikelflüssigkeit vollständig abgesaugt. Die Punktion erfolgte entweder mit einer Spritze von Hand oder mit einem Punktionsgerät (mikro-makro Sauger, Labotect). Die Kanülenstärke betrug in beiden Fällen 0,9 mm, der Punktionsunterdruck bei der automatischen Punktion 250 mm Hg. Die Follikelflüssigkeit wurde gepoolt, in konischen Zentrifugenröhrchen gesammelt und 15 min zur Sedimentation der Zellen und Oozyten stehen gelassen.

Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurde das Sediment in eine Petrischale pipettiert, aus der dann unter einem Stereomikroskop bei 12-facher Vergrößerung die Oozyten entnommen wurden. Anschließend wurden die Oozyten 3x in mod. Tyrode's Medium (siehe 3.8-IV) gewaschen. Hierbei erfolgte eine erste Selektion, wobei nur Oozyten mit kompaktem Cumulus oophorus weiter verwendet wurden. Eine zweite Selektion erfolgte durch eine Lebend-Tot-Färbung mit 0,2 %iger Trypanblaulösung. Oozyten mit gefärbtem Cumulus wurden verworfen, solche mit lebendem, ungefärbtem Cumulus nach Auswaschen des anhaftenden Farbstoffes in das jeweilige Reifungsmedium überführt (LEIBFRIED, 1984, persönliche Mitteilung).

3.2 Oozytenreifung

Die Mehrzahl der Reifungsversuche wurde in modifiziertem Tyrode's Medium unter Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem foetalen Kälberserum, Pyruvat (11 µg/ml) und FSH (10 µg/ml) durchgeführt (LENZ et al., 1983). Zu Beginn der Versuchsperiode wurden vergleichend dazu ein Medium nach NEWCOMB (siehe 3.8 - X) und gepoolte, sterilfiltrierte Rinderfollikelflüssigkeit zur Inkubation verwendet. Darüberhinaus wurden vergleichende Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Reifung in Cokultur mit Granulosazellen erfolgte (siehe 3.3).

Anfänglich erfolgte die Inkubation in Mikrotropfen (50 µl) mit jeweils 5 Oozyten unter Paraffinüberschichtung. In der zweiten Versuchsphase wurden jeweils ca. 30 Oozyten in 3 ml Medium in Petrischälchen (Nunc) kultiviert. Die Inkubationsbedingungen für die Reifung waren einheitlich 39⁰ C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Als Kontrollgruppe dienten Oozyten, die in PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ohne Zusätze inkubiert wurden.

3.3 Inkubation von Granulosazellen

Zur Gewinnung von Granulosazellen wurden ebenfalls Ovarien von Schlachtrindern verwendet. Um nach Möglichkeit Follikel des Proöstrus bis Östrus zu gewinnen, erfolgte eine Bestimmung des ovariellen Zyklusstandes anhand der Morphologie des Corpus luteum (IRELAND et al., 1980). Die Ovarien für die Follikelgewinnung wurden gesondert in BSS (Balanced Salt Solution, siehe 3.8-I) auf Eis transportiert. Follikel einer Größe über 10 mm Durchmesser wurden mit Hilfe eines Skalpells schonend von Ovargewebe freipräpariert. Unter einem Stereomikroskop wurden mit Uhrmacherpinzetten alle verbleibenden Schichten bis auf die Theka folliculi entfernt. An den derart präparierten Follikeln erfolgte eine Qualitätsbestimmung nach den Kriterien von KRUIP und DIELEMAN (1982). Nur Follikel, die der Einstufung 'nicht atretisch' und 'leicht atretisch' entsprachen wurden für die Gewinnung von Granulosazellen verwendet.

Beurteilungskriterien:

- nicht atretisch

Einheitliches, klares Aussehen mit reichlicher und sehr feiner Vaskularisation, sowie einer regelmäßigen Granulosazellschicht. Freischwimmende Partikel in der Follikelflüssigkeit fehlen.

- leicht atretisch

Zunehmender Verlust des durchscheinenden Aussehens, wenige, sehr kleine freischwimmende Partikel.

Die Theka folliculi wurde geöffnet und nach Entleerung der Follikelflüssigkeit in einer Petrischale von Medium bedeckt gewendet. Anschließend wurde mit einer Pinzette die Granulosaschicht vorsichtig abgestreift. Die Zellen von mehreren Follikeln wurden gepoolt, in BSS gewaschen und bei 500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einer definierten Menge Kulturmedium resuspendiert. Nun erfolgte die Zellzählung mit einer Zählkammer nach Neubauer und eine Lebend-Tot-Färbung mit 0,01 % Trypanblau.

Die Inkubation erfolgte in Petrischalen in TCM 199 (Flow Laboratories) unter Zusatz von 10 % foetalem Kälberserum, FSH (10 µg/ml) und Pyruvat (11 µg/ml). Die Zellkonzentration betrug 1×10^6 Zellen/ml, wobei nur Zellsuspensionen verwendet wurden, die einen Mindestanteil von 50 % lebenden Zellen aufwiesen.

In vergleichenden Versuchsansätzen erfolgte ein Zusatz von Vitamin A (Retinol, 0,3 µg/ml) bzw. Serumlipoproteinen in physiologischer Konzentration, die bei einer Dichte von 1,2 g/ml in der Ultrazentrifuge gewonnen wurden (DE LALLA und GOFMAN, 1954). Da Vitamin A in Äthanol gelöst war erfolgte als Kontrolle eine Kultur unter Zusatz einer gleichen Menge Äthanol (1 µl/10 ml) ohne Zusatz von Vitamin A.

2 h nach Inkubationsbeginn und nach Ablauf der 24stündigen Reifungszeit wurden Proben der Kulturmedien gezogen, die bis zur weiteren Verarbeitung in Kulturröhrchen bei -20°C tiefgefroren wurden. Nach Abschluß der Versuchsreihe wurden diese Proben mittels Radioimmunoassay auf ihren Gehalt an Progesteron und 17- β Östradiol untersucht. Diese Untersuchungen wurden freundlicherweise von Mitarbeitern des Instituts für Physiologie der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft Weißenstephan durchgeführt.

3.4 In vitro Fertilisation (IVF)

3.4.1 IVF mit Frischsperma

Für die IVF mit Frischsperma wurde frisches Ejakulat von jeweils einem Prüfbullen je Versuchsansatz von der Besamungsstation Grub zur Verfügung gestellt. Nach routinemäßigen Qualitätskontrollen, erster Verdünnungsreihe und Kühlung auf 5°C wurde das Sperma ins Labor gebracht. Anschließend erfolgte eine Aufschwemmung von 1 ml verdünntem Sperma in 10 ml modif. TL-Medium (+ 6 mg/ml BSA). Die Spermasuspension wurde bei 200 g 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Spermapellet in frischem Medium resuspendiert. 2 μl dieser Suspension wurden in 48 μl Mikrotropfen TL-Medium pipettiert, die 2 μl PHE und jeweils 5 Oozyten enthielten. Die Mikrotropfen wurden mit Paraffin überschichtet und 24 h bei 39°C , 5 % CO_2 und ca. 96 % Luftfeuchtigkeit inkubiert (in Anlehnung an BALL et al., 1983).

3.4.2 IVF mit TG- N_2 -Sperma

Das Tiefgefriersperma für die IVF-Versuche wurde von der Besamungsstation Meggle, Reitmehring zur Verfügung gestellt. Für die Dauer der gesamten Versuchsreihe wurde ausschließlich Sperma des Bullen Harzer, #14310 verwendet. Pro Versuchsansatz wurden jeweils 3 Pailletten 1 min. im Wasserbad bei 35°C aufgetaut. 4 Plastikreagenzröhrchen wurden mit jeweils 1 ml TL-Medium (siehe 3.8-III) beschickt, mit je 250 μl Sperma unterschichtet, verschlossen und im Wasserbad bei 39°C 1 h inkubiert.

Bei dieser Methode kommt es zu einer Anreicherung der vorwärtsbeweglichen Spermien im überschichteten Medium, so daß zu den Mikro-

tropfen fast ausschließlich lebende, motile Spermien gegeben werden. Tote Spermien und Zelldetritus verbleiben im Verdünner. Nach der 1stündigen Inkubation wurden jeweils 850 µl vom Überstand abgehebert, gepoolt und bei 200 g 10 min. zentrifugiert. Der hierbei entstehende Überstand wurde verworfen, das Spermapellet in der gleichen Menge TL-Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Von dem neuerlichen Spermapellet erfolgte nach Abhebern des Überstandes eine Dichtebestimmung und anschließend wurde durch Zugabe von TL-Medium die Endkonzentration eingestellt.

Die Fertilisation erfolgte in 50 µl Mikrotropfen (siehe 3.8-VI) mit jeweils 5 Oozyten je Tropfen unter Paraffin (PARRISH et al., 1986). Die Spermienkonzentration in den Mikrotropfen betrug $2,5 \times 10^6/\text{ml}$. In der TG-N₂-Sperma Versuchsreihe wurde das Paraffinum perliquidum vor der Verwendung 24 h lang mit physiologischer Kochsalzlösung äquilibriert. Hierbei saugen Kapillarräume im Paraffin die Kochsalzlösung an. Dadurch wird verhindert, daß bei der späteren Inkubation den Medientropfen Flüssigkeit entzogen wird, was eine Konzentrationsänderung bewirken würde.

Die Inkubationsbedingungen bei den Versuchen mit TG-Sperma entsprachen denen der Fertilisation mit Frischsperma (siehe 3.4.1). Parallel zu jedem Versuchsansatz wurde eine Kontrolle auf Parthenogenese durchgeführt. Medien und Inkubationsbedingungen änderten sich hierbei nicht, lediglich die Spermien wurden kurz vor der Zugabe durch kurzfristiges Erhitzen abgetötet.

3.5 In vitro Kultur

Nach 24 h Inkubation im Fertilisationsmedium wurde ein Teil der Oozyten weiter kultiviert. Diese Kultur erfolgte wiederum in Mikrotropfen mit Whitten Medium (10 % FCS/siehe 3.8 - IX) oder TCM 199 (10 % FCS) unter Paraffinüberschichtung bei 39° C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Dauer variierte zwischen 24 und 72 h.

3.6 In vivo Kultur

Oozyten, die für die in vivo Kultur vorgesehen waren, wurden nach der Fertilisation zunächst mehrmals in Transfermedium gewaschen (siehe 3.8-VIII) und in diesem Medium bis zum Transfer belassen. Als Empfängertiere dienten entweder pseudogravide Hauskaninchen oder Schafe der Merinolandrasse, die durch die Applikation von Vaginalschwämmchen (Chronogest^R, 40 mg Flugeston-acetat, Intervet) synchronisiert wurden und sich während der Kultur im Diöstrus befanden. Die Übertragung der Oozyten wurde bei beiden Tierarten in Vollnarkose durchgeführt (Kaninchen: Pentobarbital i.v. 80 mg/kg; Schaf: Xylacin i.m. 0,025 mg/kg; Ketamin i.v. 5 mg/kg). Nach Rasur, Desinfektion und Abdeckung wurde zunächst die Bauchdecke durch einen Schnitt von 4 cm kaudal des Nabels bzw. von 10 cm unmittelbar kranial des Euteransatzes in der linea alba geöffnet. Nun wurde der Uterus vorgelagert und Ovar mitsamt Eileiter einer Seite dargestellt. Die Hornspitze des Uterus wurde unmittelbar am Übergang zum Eileiter ligiert, um ein Abwandern der Oozyten in den Uterus zu verhindern. Anschließend wurden die Oozyten mit Hilfe einer gebogenen abgeschmolzenen Glaskapillare mit wenig Medium über den Fimbrientrichter möglichst tief in den Eileiter abgesetzt. In den zweiten Eileiter wurde jeweils die Kontrollgruppe zur Bestimmung der Parthenogeneserate übertragen. Der Verschluss der Bauchdecke erfolgte durch eine dreischichtige Naht mit Chromcatgut und Synthofil. Nach 72 h Kulturdauer erfolgte die Wiedergewinnung der Oozyten. Zu diesem Zweck wurden die Eileiter bzw. Eileiter und Uteri (Kaninchen) exstirpiert, die Ligatur entfernt, vom Uterus aus zum Fimbrientrichter gespült (Medium siehe 3.8-VIII) und die Spülflüssigkeit jeweils eines Eileiters in einem Petrischälchen aufgefangen.

3.7 Beurteilung

Die Beurteilung von Reifung und Fertilisation erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten mit unterschiedlichen Methoden. Zu Beginn der Versuchsphase erfolgte lediglich eine Endbeurteilung nach Fertilisation und weiterer Kultur in vivo oder in vitro. Einziger Maßstab für Reifung, Fertilisation und Kultur war hier die Teilungsrate der Oozyten. Oozyten, die keine gleichmäßige Teilung aufwiesen, wurden nach folgenden Kriterien unterschieden:

- keine Weiterentwicklung: Oozyten mit gleichmäßig feingranuliertem Zytoplasma ohne Anzeichen einer beginnenden Teilung oder Degeneration
- Fragmentation : Teilung in ungleich große Blastomeren, die nicht von einer deutlich sichtbaren Zellmembran umgeben waren
- Degeneration : Starke Granulierung des Zytoplasmas, Schrumpfung des Zytoplasmas, teilweise oder völlige Lysis der Zellmembran

Es folgte eine Aufgliederung in verschiedene Beurteilungsschritte. 24 h nach Inkubationsbeginn erfolgte eine Nativbeurteilung der Kernreifung. Zu diesem Zweck wurde der Cumulus mit Hilfe einer 1 %igen Hyaluronidase-Lösung und mehrmaligem Aufsaugen der Oozyten in eine feine Glaspipette entfernt. Anschließend wurden die Oozyten auf das Vorhandensein des 1. Polkörperchens untersucht. Nach 24stündiger Inkubation im Fertilisationsmedium wurden von den Oozyten, die nicht für weitere Kulturversuche vorgesehen waren, ebenfalls der Cumulus entfernt. Anschließend wurden diese Oozyten mit einem Gemisch aus Äthanol und Eisessig (1:3) fixiert, nach 24 h mittels Interferenzkontrast beurteilt und für eine weitere Beurteilung mit Aceto-Orcein (1 %) gefärbt. Nach der Färbung erfolgte die Beurteilung mittels Phasenkontrast.

Nach Kultivierung orientierte sich die Bewertung zunächst an der Weiterentwicklung der Oozyten. Darüberhinaus wurde ein Teil der in vivo kultivierten Eizellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Basic-Red 1,5 %, AMSELGRUBER, 1986, persönliche Mitteilung) gefärbt und in einer Nativbeurteilung die Zahl der fluoreszierenden Kerne mit der Anzahl der Blastomeren verglichen. Für die mikroskopische Beurteilung wurde ein Inversmikroskop (Zeiss ICM 405) verwendet.

Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe des χ^2 -Tests durchgeführt.

3.8 Zusammenstellung der verwendeten Medien

I. BSS: Balanced Salt Solution

1000 ml: 8,0 g NaCl
 0,2 g KCl
 2,0 g Glucose
 1,0 g NaHCO₃
 300 mg Penicillin
 500 mg Streptomycinsulfat
 10 ml Phenolrotlösung (0,1 %)

II. Modifiziertes Tyrode-Lactat Medium (TL-Medium) (BAVISTER und YANAGIMACHI, 1977)

100 ml: 666,0 mg NaCl
 23,5 mg KCl
 22,6 mg CaCl₂ (x 2 H₂O)
 9,98 mg MgCl₂ (x 6 H₂O)
 210,5 mg NaHCO₃
 4,76 mg NaH₂PO₄ x H₂O
 153,1 mg Glucose
 111,6 mg Na-Lactat
 6,5 mg Penicillin
 1,0 mg Phenolrot

Von den einzelnen Komponenten werden wegen der dadurch zu erreichenden besseren Genauigkeit zunächst Stammlösungen hergestellt, aus denen das Medium dann gemischt wird.

Osmolarität 280-290 mOsmol

III. Modifiziertes TL-Medium für die Sperm Swim up Procedure (CRITSER und LEIBFRIED, 1984, persönliche Mitteilung)

100 ml: 582,6 mg NaCl
 28,9 mg CaCl₂
 23,0 mg KCl
 7,9 mg MgCl₂ (x 6 H₂O)
 4,0 mg NaH₂PO₄ (x H₂O)
 220,8 mg Na-Lactat
 11,0 mg Pyruvat
 238,0 mg Hepes-Puffer
 209,0 mg NaHCO₃
 600,0 mg BSA
 90,1 mg Glucose
 1,0 mg Phenol-Rot
 5,0 mg Gentamycin

pH: 7,4

Osmolarität 280-290 mOsmol

IV. Waschlösung für die Oozyten

TL-Medium

240mg /100 ml Hepes Puffer (Osmolarität ausgleichen)

5 - 10 % FCS

25 mg/100 ml Gentamycin

pH: 7,4

Osmolarität 280-290 mOsmol

V. Reifungsmedium für Oozyten

TL-Medium

10 % FCS

10 µg/ml FSH

11 µg/ml Pyruvat

VI. Medium für die IVF

TL-Medium

5 % FCS

11 µg/ml Pyruvat

10 µg/ml Heparin

1 µM/ml Epinephrin

10 µM/ml Hypotaurin

20 µM/ml Penicillamin } PHE

VII. Medium für die Cokultur mit Granulosazellen

TCM 199 (Flow Lab.: Earle's Salze, mit Glutamin und 20 mM Hepes,
ohne Natriumbicarbonat)

10 % FCS

10,0 µg/ml FSH

11,0 µg/ml Pyruvat

0,1 mg/ml Penicillin-G Natrium Salz

VIII. Medium für den Transfer und die Spülung in vivo kultivierter Oozyten (WILLADSEN, 1981)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)

angereichert mit

0,036 g/l Na-Pyruvat

1,0 g/l Glucose

4,0 g/l BSA

25 mg/l Kanamycin

1,0 ml/l 0,1 % Phenolrotlösung

IX. Whitten-Medium
(WHITTEN, 1970)

100 ml: 514,0 mg NaCl
36,0 mg KCL
16,0 mg KH PO₄
29,0 mg MgSO₄ 7 H₂O
190,0 mg NaHCO₃
3,5 mg Na-Pyruvat
53,0 mg Ca-Lactat 5 H₂O
100,0 mg Glucose
8,0 mg K-Penicillin G
5,0 mg Streptomycin SO₄

X. Medium nach NEWCOMB (1978)

Ham's F 10 Medium
20 % Serum von Rindern im Östrus
146,0 µg/ml L-Glutamin
1,0 µg/ml 17-β Östradiol
1 IE/ml HCG
2,5 µg/ml Amphotericin B
100,0 µg/ml Kanamycin
10 mM Hepes Puffer

4. ERGEBNISSE

4.1 Oozytengewinnung

Bei der Gewinnung von Schlachtovarien wurde über eine kurze Zeitdauer der Versuchsperiode ermittelt, welcher Anteil an Eierstöcken von einer Anzahl geschlachteter Tiere für die Follikelpunktion gewinnbar bzw. brauchbar war. Hierbei wurden 526 Tiere erfaßt. Von 64 (12,2 %) dieser Tiere konnten die Ovarien nicht entnommen werden, da sie durch fehlerhaftes Ausweiden im Schlachtkörper verblieben. 61 Tiere (11,6 %) hatten zystöse Veränderungen der Eierstöcke, 36 Tiere (6,8 %) wurden auf Grund von Graviditäten verschiedener Stadien ausgeschlossen und bei 16 Tieren (3,0 %) waren sonstige Gründe (z.B. Atresie, Verwachsungen) für einen Ausschluß ausschlaggebend. Zusammengefaßt betrug der Anteil von Tieren, deren Ovarien nicht verwendet wurden 33,7 %.

Die verwendeten Ovarien wiesen im Durchschnitt $12 \pm 5,8$ oberflächlich sichtbare Follikel einer Größe zwischen 2 und 5 mm auf. Ein Vergleich der Follikelpunktion von Hand und mit einem Punktionsautomaten (Tabelle 2) erbrachte einen deutlichen Unterschied in der Gewinnungsrate (43,7 % bzw. 50,8 %; $p < 0,001$). Die Oozyten, die mittels Punktionsgewonnen wurden, wiesen einen höheren Anteil kompakter Cumuli auf ($p < 0,001$).

Tabelle 2: Vergleich der Oozytengewinnung mittels unterschiedlicher Punktionsmethoden

	Handpunktion	Punktionsautomat
Anzahl der Ovarien	107	177
oberflächlich sichtbare, punktierte Follikel (2-5 mm Ø)	1241	2092
Follikel/Ovar	11,6 ± 5,8	11,8 ± 5,9
Gewonnene Oozyten	542	1063
Gewinnungsrate Oozyten/punkt. Follikel (%)	43,7	50,8
Oozyten mit kompaktem Cumulus Oophorus (%)	205 (37,8)	521 (49,0)
Oozyten/Ovar	5,1	6,0
Oozyten/Tier (lebender Cumulus)	5,5	6,4

Die Lebend-Tot-Färbung mit Trypanblau ergab bei 418 registrierten Oozyten einen Anteil von 53,3 % lebenden, nicht gefärbten bzw. 46,7 % mit totem, gefärbtem Cumulus.

Ein Vergleich zwischen beiden Punktionsmethoden erbrachte keinen Unterschied. Von 277 Oozyten, die mittels Punktionsgerät gewonnen wurden, waren 53,1 % nicht gefärbt, von 141 handpunktierten 53,9 %.

Der Prozentsatz an Oozyten mit lebendem Cumulus lag etwas höher als der Prozentsatz mikroskopisch als kompakt beurteilter Cumuli, was vor allem bei den Zahlen der Handpunktion deutlich wurde ($p < 0,001$).

Vermutlich kam es durch den Punktionsvorgang bei einem geringen Anteil der Oozyten zu einer mechanischen Schädigung des Cumuluszellverbandes, wovon die verbleibenden Zellen nicht betroffen wurden. Solche Oozyten waren folglich für die Inkubation noch geeignet.

Faßt man die Daten der Oozytengewinnung zusammen, so konnten von einem geschlachteten Tier ohne Berücksichtigung der Ausfallrate am Schlachthof mittels Punktion von Hand 5,5 bzw. mittels Punktion mit einem Automaten 6,4 Oozyten gewonnen werden, die einen lebenden Cumulus aufwiesen und somit für die Inkubation geeignet waren. Die beiden Punktionsmethoden unterschieden sich sowohl in der Gewinnungsrate als auch in der Qualität der gewonnenen Oozyten.

4.2 I. Versuchsperiode

4.2.1 Ausschließliche in vitro Kultur

In dieser Versuchsperiode wurden die Teilungsergebnisse nach 48-72 h Kultur (post fertilisationem) als Beurteilungskriterien zugrunde gelegt. Somit war eine getrennte Quantifizierung von Reifungs- bzw. Fertilisationsraten nicht möglich.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 aufgelistet. Nur ein äußerst geringer Teil der unterschiedlich gereiften Oozyten wiesen nach in 100 vitro Fertilisation und in vitro Kultur eine Weiterentwicklung auf (0,8 - 8,1 %), die jedoch nicht über die erste Teilung hinausging. Ein Vergleich der verschiedenen Reifungsmedien erbrachte eine höhere Teilungsrate bei Oozyten, die in Follikelflüssigkeit aus Graaf'schen Follikeln (6,8 %) bzw. in FCS (8,1 %) gereift wurden ($p < 0,01$). Bei allen Oozytengruppen, die in Follikelflüssigkeit gereift wurden, war der Anteil fragmentierter Oozyten erhöht ($p < 0,001$). Von den übrigen Reifungsgruppen wies lediglich die Kontrolle in Newcomb's Medium einen erhöhten Anteil fragmentierter Oozyten auf.

Tabelle 3: I. Versuchsperiode: Oozytenreifung in verschiedenen Medien

Anzahl beurteilter Oozyten	keine Weiterentwicklung (%)	a)		b)		c)
		Teilung (%)		Fragmentation (%)		Degeneration (%)
mod. TL-Medium						
258	123 (47,7)	d) 2 (T) (0,8) 2		6 (2,3)		127 (49,2)
Kontrolle						
63	37 (58,7)	-		1 (1,6)		25 (39,7)
Newcomb's Medium						
FCS 505	194 (38,4)	10 (T) (2,0) 2		18 (3,6)		283 (56,0)
SKÖ 145	77 (53,1)	2 (T) (1,4) 2		4 (2,8)		62 (42,7)
Kontrolle						
FCS 96	48 (50,0)	2 (T) (2,1) 2		8 (8,3)		38 (39,6)
Follikelflüssigkeit						
KF 147	62 (42,2)	5 (T) (3,4) 2		20 (13,6)		60 (40,8)
GF 44	31 (70,5)	3 (T) (6,8) 2		6 (13,6)		4 (9,1)
Kontrolle						
KF 57	30 (52,6)	2 (T) (3,5) 2		10 (17,5)		15 (26,4)
FCS 37	15 (40,5)	3 (T) (8,1) 2		1 (2,7)		18 (48,7)

- a) Oozyten mit gleichmäßig feingranuliertem Zytoplasma ohne Anzeichen einer beginnenden Teilung oder Degeneration
- b) Als Fragmentation wurde gewertet:
 - Teilung in ungleich große Blastomeren
 - Blastomeren, die nicht von einer deutlich sichtbaren Zellmembran umgeben waren
- c) Als Anzeichen einer Degeneration wurden gewertet:
 - starke Granulierung des Zytoplasmas
 - deutliche Schrumpfung des Zytoplasmas
 - teilweise oder völlige Lysis der Zellmembran
- d) T₂ - Teilung in 2 Blastomeren

FCS = Proteinquelle: FCS

SKÖ = Proteinquelle: Serum von Kühen im Östrus

KF = Follikelflüssigkeit aus kleinen Follikeln (2 - 5 mm Ø)

GF = Follikelflüssigkeit aus Graaf'schen Follikeln

Bei allen Versuchen mit ausschließlicher *in vitro* Kultur waren die Teilungsraten der Kontrollgruppen (Inkubation ohne Spermienzugabe) nicht signifikant niedriger als bei fertilisierten Oozyten. Eine Unterscheidung zwischen Parthenogenese und Fertilisation war daher in diesem Versuchsansatz nicht möglich.

4.2.2 *In vivo* Kultur nach Fertilisation

Durch die *in vivo* Kultur in Kanincheneileitern wiesen *in vitro* gereifte und *in vitro* fertilisierte Oozyten im Vergleich zur *in vitro* Kultur höhere Teilungsraten auf (Tabelle 4, $p < 0,01$). Ein Vergleich zwischen Oozyten, die zur Reifung in Necomb's Medium bzw. in Follikelflüssigkeit inkubiert wurden ergab eine höhere Teilungsrate bei den in Follikelflüssigkeit inkubierten Oozyten ($p < 0,01$). Die Kontrollgruppe nicht fertilisierter Oozyten wies hierbei deutlich niedrigere Werte auf ($p < 0,001$). Bei den in Newcomb's Medium gereiften Oozyten war wiederum eine Unterscheidung zwischen Parthenogenese und Fertilisation nicht möglich.

Tabelle 4: I. Versuchsperiode: In vivo Kultur

Reifungs- medium	über- tragene Oozyten	ausge- spülte Oozyten	Wieder- findungs- rate %	T 2	T 3-8	Fragmen- tation	Degene- ration	Teilungs- rate %
Newcomb (FCS)	76	55	72,4	4	-	17	18	7,3
Newcomb (FCS)	54	39	72,2	2	1	4	8	7,7
Summe	130	94	72,3	6	1	21	26	7,5
Follikel- flüssig- keit (2-5 mm)	36	4	11,1	1	1	-	-	50,0
Kontrolle								
Follikel- flüssig- keit (2-5 mm)	33	27	81,8	-	-	-	19	0
Follikel- flüssig- keit (2-5 mm)	40	40	100	1	2	15	7	7,5
Summe	73	67	91,8	1	2	15	26	4,5

T₂ = Teilung in 2 Blastomeren

T₃₋₈ = Teilung in 3 - 8 Blastomeren

4.3 II. Versuchsperiode

4.3.1 Oozytenreifung

105 Oozyten, bei denen unmittelbar nach der Punktion die Cumuluszellen entfernt wurden, wiesen zum Zeitpunkt der Beurteilung kein Polkörperchen auf. Stichprobenartig wurden Oozyten unmittelbar nach der Punktion fixiert. Diese Oozyten befanden sich größtenteils im Germinalvesikelstadium (Abbildung 1).

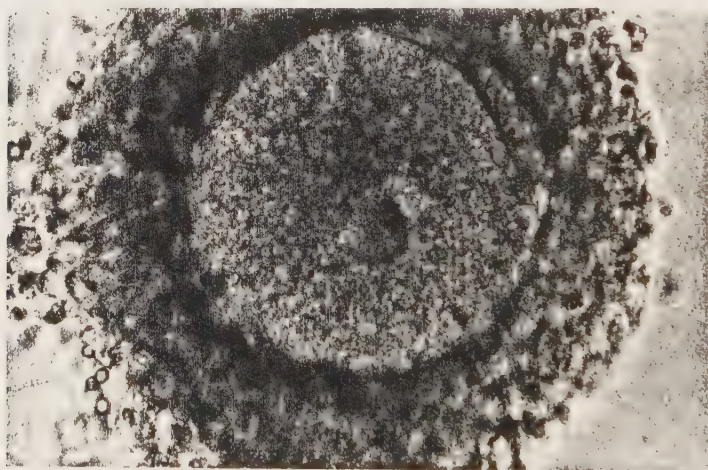


Abbildung 1: Rinderoozyte mit kompaktem Cumulus und Germinalvesikel (mikroskopische Vergrößerung 400fach, fixiert nach der Punktion)

Die subjektive Beurteilung der Expansion des Cumulus oophorus 24 h nach Inkubationsbeginn ergab folgende Ergebnisse: Von insgesamt 642 Oozyten, bei denen die Expansion im Einzelnen beurteilt und protokolliert wurde, wiesen im Durchschnitt 78,5 % eine sehr gute gleichmäßige Expansion auf (+++) (Abbildung 2). 11,7 % expandierten weniger deutlich, 4,5 % wiesen zum Teil noch kompakte oder verklumpte Bezirke im Cumulus auf und 5,3 % der Oozyten zeigten keine Veränderungen im Vergleich zum Vortag (Tabelle 5).

Tabelle 5: Expansion des Cumulus oophorus/TL Medium

Anzahl beurteilter Oozyten	Expansion			keine Veränderung (%)
	+++ (%)	++ (%)	+ (%)	
642	504	75	29	34
	(78,5)	(11,7)	(4,5)	(5,3)
x	(35,7-94,8)	(0-64,3)	(0-57,2)	(0-27,8)

x = Variationsbreite der verschiedenen Versuchsansätze

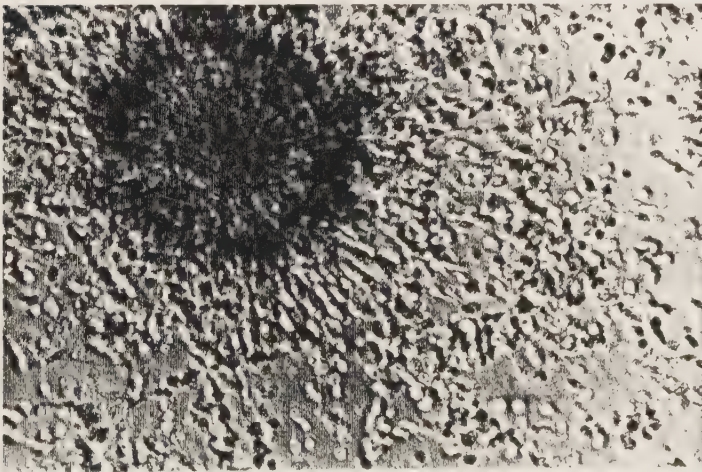


Abbildung 2: Expandierte Rinderoocyte 24 h nach Inkubationsbeginn
fixiert (mikroskopische Vergrößerung 160fach, Interferenz-
kontrast

Nach 24stündiger Inkubation in verschiedenen Medien fand bei einem hohen Prozentsatz der Oozyten eine Vollendung der Meiose statt (Tabelle 6; Abbildung 3). Zur Bestimmung der Meioserate wurden Oozyten, die bereits nach dieser kurzen Inkubationsdauer starke Degerenerationerscheinungen aufwiesen nicht berücksichtigt. Hier kann man davon ausgehen, daß diese Prozesse bereits innerhalb des Follikels begonnen haben, die Cumuluszellen zum Zeitpunkt der Punktion jedoch noch nicht davon betroffen waren.

Tabelle 6: In vitro Reifung von Rinderoozyten

Medium	Anzahl beurteilter Oozyten	1 Polkörperchen (%)	Degeneration	a) Meioserate (%)
TL-Medium	460	295 (64,1) x(20-100)	57	73,2
Granulosa- Cokultur				
b)				
I	61	41 (67,2) x(63,3-100)	9	78,8
c)				
II	66	50 (75,6) x(66,6-77,1)	4	80,6
d)				
III	42	31 (73,8) x(60,0-81,3)	4	81,6
e)				
IV	19	14 (73,7) x(66,6-80,0)	2	82,4
Summe	188	136 (72,3)	19	80,5
Follikel- flüssigkeit				
2-5 mm $\emptyset$	37	2 (5,4) x(0-33)	1	5,5
Graaf'scher Follikel	25	13 (83,3) x(0-83,3)	-	83,3

a) nach Abzug degenerierter Oozyten

x Variationsbreite der verschiedenen Versuchsansätze (%)

Granulosa-Cokultur in TCM 199

- b) ohne Zusätze
- c) mit Lipoproteinen in Serumkonzentration
- d) Vitamin A 0,3 µg/ml
- e) Äthanol 1 µl/10 ml

Oozyten, die in Cokultur mit Granulosazellen gereift wurden wiesen im Vergleich zu den anderen Reifungsmedien geringgradig höhere Meiose-raten auf ($p < 0,05$). Innerhalb der verschiedenen Granulosagruppen war kein Unterschied feststellbar (78,8 - 82,4 %). Die Inkubation in Follikelflüssigkeit aus Graaf'schen Follikeln erwies sich der in Flüssigkeit aus kleinen Follikeln deutlich überlegen ($p < 0,001$) und unterschied sich nicht von der Reifung in TL-Medium (73,2 %).

Von 51 Oozyten, die als Kontrolle in PBS inkubiert wurden, wiesen nur 6 eine mäßige Expansion des Cumuluszellverbandes auf. 45 Oozyten zeigten keine Veränderung. Lediglich eine von 51 Oozyten wies zum Zeitpunkt der Beurteilung (24 h nach Inkubationsbeginn) ein Polkörperchen auf.



Abbildung 3: Denudierte Rinderoocyte, 24 h nach Inkubationsbeginn - ein Polkörperchen im perivitellinen Raum (mikroskopische Vergrößerung 400fach, nativ)

4.3.2 In vitro Fertilisation

In diesem Versuch wurden Rinderoozyten, die in verschiedenen Medien 24 Stunden gereift wurden auf ihre Fertilisierbarkeit hin untersucht. Die Methode der in vitro Fertilisation war hierbei für sämtliche Oozyten gleich, die Kontrollgruppe wurde mit abgetötetem Sperma co-inkubiert.

In TL-Medium gereifte Oozyten wurden nach der Inkubation in Fertilisationstropfen zu rund einem Drittel (35,3 %) aktiviert, wobei bei 52,1 % der aktivierten Oozyten sowohl männlicher als auch weiblicher Vorkern ausgebildet wurden (Tabelle 7; Abbildung 4). 40,3 % der aktivierten Oozyten bildeten lediglich einen Vorkern aus. Durch eine Untersuchung mittels Phasenkontrast konnten bei einem Teil dieser Oozyten Spermienteile (Spermienkopf, Schwanz) nachgewiesen werden (Abbildung 5), so daß davon ausgegangen werden kann, daß diese Oozyten zwar penteriert wurden, eine Dekondensation des Spermienkopfes zum männlichen Vorkern jedoch noch nicht stattgefunden hat. 2 der untersuchten Oozyten hatten 24 h nach Fertilisationsbeginn bereits die erste Teilung vollzogen. 6,4 % der Oozyten wiesen eine abnorme Entwicklung wie z.B. Mehrkernigkeit auf. Vermutlich ist dies auf eine Penetration durch mehreren Spermien zurückzuführen, da sich auch hierfür bei der Untersuchung mit Phasenkontrast Hinweise ergaben. Bei der Kontrollgruppe (Oozyten, die mit abgetötetem Sperma inkubiert wurden) lag die Aktivierungsrate bei nur 3,6 %. Nur eine von insgesamt 109 Oozyten bildete parthenogenetisch 2 Vorkerne aus, bei 3 Oozyten kam es zur Ausbildung von einem Vorkern (Tabelle 7).

Eine Verbesserung der Fertilisationsraten konnte durch die Reifung der Oozyten in Granulosazellkulturen erzielt werden (Tabelle 8). Innerhalb der einzelnen Gruppen in Cokultur gereifter Oozyten ergab sich kein Unterschied, lediglich in der Gruppe IV bildete ein geringerer Anteil der Oozyten beide Vorkerne aus ($p < 0,01$). Die einzelnen Gruppen unterschieden sich durch Zusatz von Lipoproteinen, Vitamin A bzw. Äthanol zu den Kulturmedien. Ein Vergleich zu in TL-Medium gereiften Oozyten ergab sowohl eine Erhöhung der Aktivierungsrate ($p < 0,05$) als auch eine sehr deutliche Steigerung des Anteils der Ausbildung beider Vorkerne ($p < 0,001$). Dies weist auf eine deutlich bessere Oozytenreifung hin, da damit der Anteil physiologisch fertilisierter Oozyten im Vergleich zu den Versuchen mit TL-Medium deutlich überwiegt. Der

Anteil an Zweizellern war ebenfalls höher ($p < 0,01$). Kein Unterschied ergab sich im Anteil an mehrkernigen (4,4 %) und parthenogenetisch aktivierten Oozyten (4,2 %). Die Kontrollgruppen unterschieden sich sowohl bei Oozyten, die in TL-Medium als auch in Granulosa-Co-kultur gereift wurden deutlich von den Fertilisationsgruppen ($p < 0,001$).

Tabelle 7: In vitro Fertilisation in TL-Medium gereifter Oozyten

Anzahl beurteilter Oozyten	Aktivierung* (%)	T 2	2 Vorkerne (% von *)	1 Vorkern (% von *)	Mehrkernig
527	186 (35,3)	2	97 (52,1)	75 (40,3)	12 (6,4)
X	(0-70,6)		(0-100)	(0-88,3)	(0-50)
Kontrolle					
109	4 (3,6)	-	1	3	-

X: Variationsbreite der verschiedenen Versuchsansätze (%)

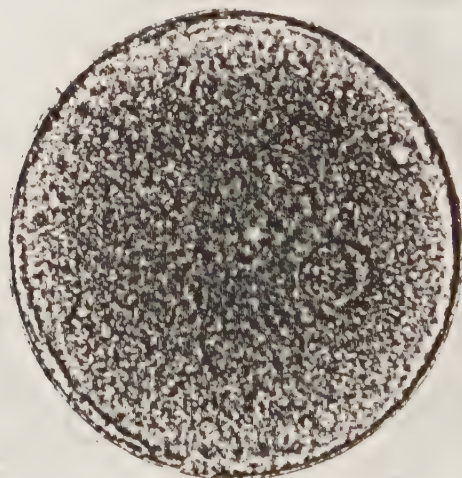


Abbildung 4: Rinderzygote mit zwei Vorkernen, 24 h nach Fertilisationsbeginn fixiert (mikroskopische Vergrößerung 400fach)

Tabelle 8: In vitro Fertilisation in Granulosa-Cokultur gereifter Oozyten

Anzahl beurteilter Oozyten	Aktivierung* (%)	a)		2 Vorkerne (% von *)	1 Vorkern (% von *)	Mehrkernig
		T	2			
I b)	135	58 (42,9)	2	45 (77,5)	9 (15,5)	2
II c)	70	29 (41,4)	3	26 (89,6)	-	-
III d)	52	26 (50,0)	1	20 (76,9)	3 (11,5)	2
IV e)	50	22 (44,0)	2	12 (54,5)	6 (27,3)	2
Summe	307	135 (43,9)	8	103 (76,3)	18 (13,3)	6

Kontrolle

I b)	93	4 (4,3)	-	1	3	-
II c)	53	3 (5,6)	-	-	3	-
III d)	45	1 (2,2)	-	-	1	-
IV e)	47	2 (4,2)	-	-	2	-
Summe	238	10 (4,2)	-	1	9	-

a) T = Teilung in 2 Blastomeren

2

Granulosa-Cokultur in TCM 199

b) ohne Zusätze

c) mit Lipoproteinen in Serumkonzentration

d) Vitamin A 0,3 µg/ml

e) Äthanol 1 µl/10 ml

4.3.3 In vitro Kultur

Die Versuche, Oozyten nach in vitro Reifung und in vitro Fertilisation auch in vitro weiterzukultivieren, haben gezeigt, daß dies nur in einem sehr geringen Umfang möglich ist (9,4 - 16,8 %) wobei die Entwicklung bereits nach der 2. Teilung, also im Vierzellstadium beendet wurde. Darüber hinaus konnte während der gesamten Versuchsdauer keine Weiterentwicklung in vitro beobachtet werden.

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich ist konnte auch durch eine Oozytenreifung in Cokultur mit Granulosazellen keine deutliche Verbesserung der Weiterentwicklungsrate in vitro erzielt werden, obwohl eine Tendenz erkennbar ist. Die Granulosa-Gruppen unterschieden sich untereinander ebenfalls nicht. Bei der Kontrolle war der Anteil fragmentierter Oozyten bei der Granulosagruppe deutlich höher als bei Oozyten, die in TL-Medium gereift wurden.

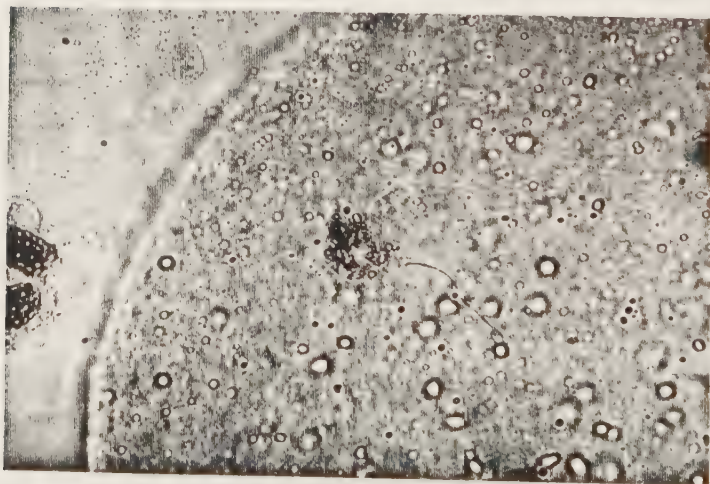


Abbildung 5: Rinderoocyte, 24 h nach Fertilisationsbeginn fixiert-dekondensierender Spermienkopf (mikroskopische Vergrößerung 630fach, Phasenkontrast)

Tabelle 9: II. Versuchsperiode:
In vitro Kultur fertilisierter Oozyten

Reifungs- medium	Anzahl beurteilter Oozyten	Teilungen	(%)	a) T	b) T	Fragmentation
				2	4	
TL-Medium	138	13	(9,4)	12	1	2
Granulosa- Cokultur						
c)						
I	70	13	(18,5)	11	2	-
d)						
II	19	2	(10,5)	2	-	-
e)						
III	20	3	(15,0)	3	-	1
f)						
IV	16	3	(18,7)	3	-	-
Summe	125	21	(16,8)	19	2	1
Kontrolle						
TL-Medium	83	-		-	-	2 (1,4 %)
Granulosa- Cokultur (Summe)						
	90	-		-	-	12 (14,4 %)

a) T = Teilung in zwei Blastomeren
2

b) T = Teilung in vier Blastomeren
4

Granulosa-Cokultur in TCM 199

c) ohne Zusätze

d) mit Lipoproteinen in Serumkonzentration

e) Vitamin A 0,3 µg/ml

f) Äthanol 1 µg/ 10 ml

4.3.4 In vivo Kultur

Die Ergebnisse einer Weiterkultur von Oozyten in Eileitern von Schafen oder Kaninchen sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: II. Versuchsperiode: In vivo Kultur

Reifungs- medium	Em- pfänger	übertragene Oozyten	wiedergew. Oozyten (%)	Teil- lungen (%)	Frag- mentation
Granulosa- Cokultur					
a)					
I	K	35	31 (88,5)	12 (39,7)	3
a)					
I	S	34	26 (76,4)	13 (50,0)	1
b)					
II	K	53	44 (83,0)	21 (47,7)	2
c)					
III	K	68	55 (80,8)	27 (49,1)	6
Summe		190	156 (82,1)	73 (46,8)	12
TL-Medium					
	K	92	74 (80,4)	21 (28,3)	13
	S	35	11 (31,4)	4 (36,3)	1
Summe		127	85 (66,9)	25 (29,4)	14

K = Kaninchen

S = Schaf

Granulosa-Cokultur in TCM 199

a) ohne Zusätze

b) mit Lipoproteinen in Serumkonzentration

c) Vitamin A 0,3 µg/ml

Tabelle 11: Kontrollgruppe

Reifungs- medium	Em- pfänger	übertragene Oozyten	wiedergew. Oozyten (%)	Teil- lungen (%)	Frag- mentation
Granulosa- Cokultur					
a)					
I	K	32	30 (93,7)	2 (6,6)	5
a)					
I	S	36	25 (69,4)	2 (8,0)	1
Summe		68	55 (80,9)	4 (7,3)	6
TL-Medium					
	K	25	13 (52,0)	2 (15,3)	3
	S	38	9 (23,7)	1 (11,1)	1
Summe		63	22 (34,9)	3 (13,6)	4

K = Kaninchen

S = Schaf

a) Granulosa-Cokultur in TCM 199 ohne Zusätze

Ein deutlich höherer Anteil der in vitro gereiften und in vitro fertilisierten Oozyten zeigten gegenüber der in vitro Kultur nach der Kultur in Eileitern von Schafen oder Kaninchen eine Weiterentwicklung ($p < 0,001$). Hierbei erwiesen sich Schafe und Kaninchen als Empfänger-tiere gleichermaßen geeignet. Sowohl in TL-Medium als auch in Granulo-sa-Cokultur gereifte Oozyten unterschieden sich in den Teilungsraten deutlich von denen der jeweiligen in vitro Kultur (29,4 %/9,4 % bzw. 46,8 %/16,8 %). Zwischen den einzelnen Granulosagruppen bestand kein Unterschied (Tabelle 10).

Im Vergleich zu Oozyten, die in TL-Medium gereift wurden lag die Weiterentwicklungsrate in vivo bei den Oozyten der Granulosa-Cokultur höher ($p < 0,005$), wobei sich ein deutlich höherer Anteil bis zu

8-Zellern entwickelte ($p < 0,01$; Tabelle 12; Abbildung 6).

Oozyten beider Reifungsgruppen wiesen nach in vivo Kultur einen höheren Anteil fragmentierter Eizellen auf als nach in vitro Kultur ($p < 0,001$; Abbildung 7).

Der Vergleich beider Reifungsmedien ergab einen höheren Anteil an Fragmentation bei Oozyten, die in TL-Medium gereift wurden.

Eine Differenzierung zwischen der Weiterentwicklung fertilisierter Oozyten und einer parthenogenetischen Teilung war lediglich bei der Gruppe der in Granulosa-Cokultur gereiften Oozyten möglich ($p < 0,001$). Die Teilungsrate in TL-Medium gereifter Oozyten unterschied sich nicht signifikant von der Parthenogeneserate der Kontrollgruppe (Tabelle 11).

Tabelle 12: II. Versuchsperiode: In vivo Kultur; Entwicklungsstadien

Reifungs- medium	Über- tragene Oozyten	wieder- gew. Oozyten	(%)	Teil- lungen (%)	a)				Frag- ment.	Deger- nerat.
					davon					
					T 2	T 3	T 4	T 8		
Granulosa- Cokultur (gesamt)	190	156 (82,1)	73 (46,8)	34	5	16	18	12	16	
TL-Medium (gesamt)	127	85 (66,9)	25 (29,4)	17	1	6	1	14	13	

a) T₂₋₈ = Teilung in 2-8 Blastomeren

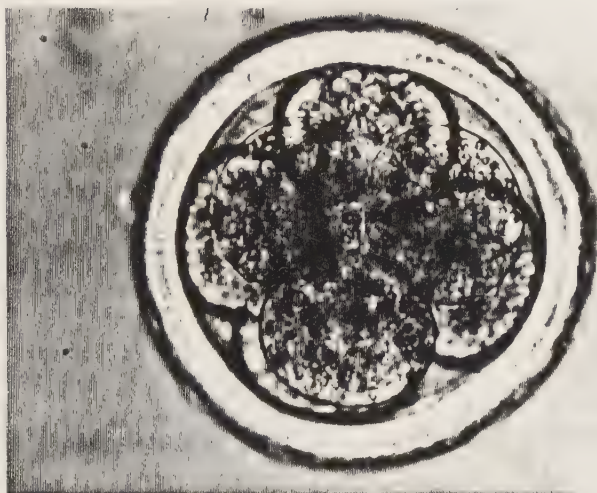


Abbildung 6: 8-Zeller nach in vivo Kultur
(mikroskopische Vergrößerung 400fach, nativ)

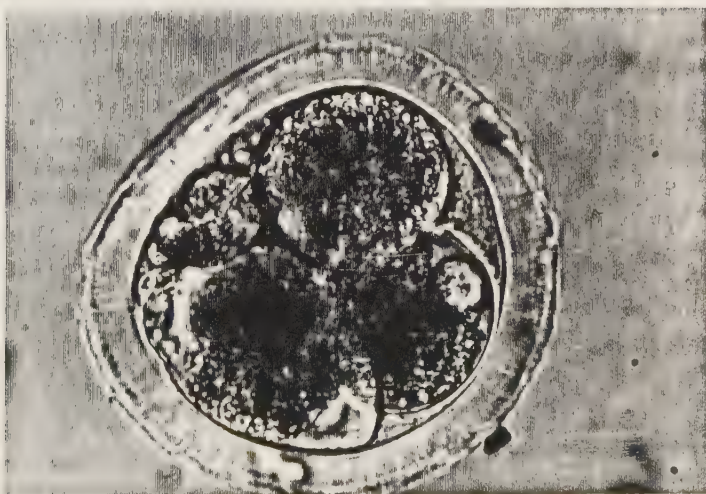


Abbildung 7: Fragmentation nach in vivo Kultur
(mikroskopische Vergrößerung 400fach, nativ)

4.3.5 Steroidsynthese der Granulosakulturen

Zur Bestimmung der Hormonproduktion der Granulosazellkulturen wurden von 23 Versuchsansätzen jeweils 2 h nach Inkubationsbeginn und zum Versuchsende (24 h nach Inkubationsbeginn) Mediumproben gezogen und mittels RJA auf die Veränderung der Steroidhormonkonzentration hin untersucht. Bestimmt wurden die Konzentrationen von Progesteron und 17- β Östradiol. Diese Untersuchungen dienten als Kontrolle der Qualität der Zellkulturen:

- a) bezüglich der Hormonaktivität der Zellen
 - b) zur Erkennung evtl. zytotoxischer Einflüsse,
- da in diesem Fall ein starker Anstieg der Hormonkonzentration unmöglich wäre.

Bei 8 von 23 Probenpaaren lag der 2 h-Progesteronwert unter der Nachweisgrenze von 0,5 ng/ml. Alle Proben wiesen einen Progesteronanstieg auf. Mit Ausnahme einer Probe (+ 70 %) lag der Anstieg bei über 150 %. Der durchschnittliche 24 h-Progesteronwert lag bei $4,7 \pm 2,7$ ng/ml. Bei 4 von 23 Proben lag der 24 h Östradiolwert außerhalb des Meßbereiches von 3300 pg/ml. 13 Proben zeigten einen Anstieg an 17- β Östradiol von über 40 %, 6 Proben wiesen einen leichten Abfall der 17- β Östradiol-Konzentrationen auf (-4 - 48 %).

Diese Ergebnisse zeigen, daß alle untersuchten Kulturen hormonaktive Granulosazellen enthielten, die sich der produzierten Hormonmenge nach zu schließen in einem frühen Stadium der Luteinisierung befanden.

4.4 Vorkerndarstellung durch Zentrifugation

Im Rahmen der Reifungs- und Fertilisationsexperimente an Rinderoozyten wurde auch die Möglichkeit geprüft, die Vorkerne durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 15.000 g darzustellen. Hierbei verlagerten sich die Lipidgranula des Zytoplasmas halbmond förmig an den Rand der Oozyte, so daß dadurch ein oder beide Vorkerne sichtbar wurden (Abbildung 8).

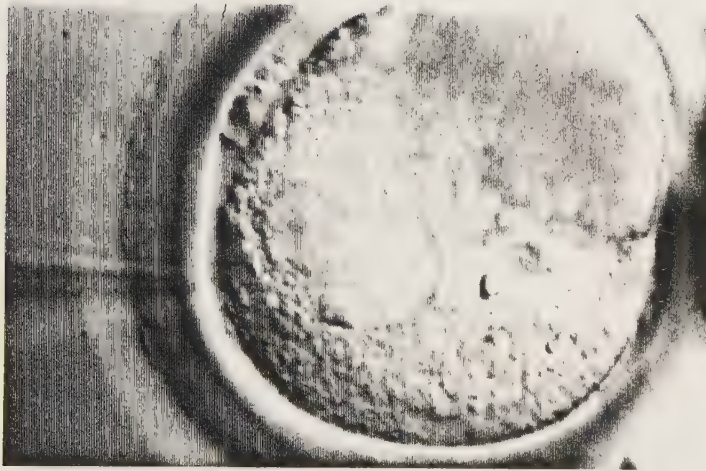


Abbildung 8: Rinderzygote mit 2 Vorkernen nach Zentrifugation mit Injektionskanüle (mikroskopische Vergrößerung 400fach, Interferenzkontrast)

5. ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN

Die Technik, Rindereizellen *in vitro* zu reifen, kann sowohl in der Forschung als auch in der Praxis zahlreiche Anwendungen finden, wobei der Schwerpunkt zunächst auf Seiten der Forschung liegen wird. In der Mehrzahl der Anwendungsbereiche stellt die *in vitro* Reifung von Oozyten hierbei eine wertvolle Ergänzung bereits etablierter Biotechniken dar bzw. schafft die Grundlagen zur Erarbeitung neuer Methoden. Im Vordergrund steht hierbei der Embryotransfer, welcher für zahlreiche neue Biotechniken in der Tierzucht und Reproduktionsbiologie eine Schlüsselposition einnimmt. Stellvertretend seien nur die *in vitro* Fertilisation und die Kryokonservierung von Embryonen genannt.

Allgemein gilt, daß als mögliche Anwendungsbereiche für *in vitro* gereifte Oozyten all diejenigen in Frage kommen, die bereits für die Technik des Embryotransfers diskutiert wurden (zur Übersicht siehe SEIDEL, 1984). Darüberhinaus öffnet die Oozytenreifung vor allen durch die Verfügbarkeit einer höheren Anzahl von weiblichen Keimzellen, die besonders beim uniparen Rind einen limitierenden Faktor darstellen, weitere Anwendungsmöglichkeiten.

Den nachfolgenden Ausführungen liegt die Annahme zugrunde, daß verbesserte Methoden es in absehbarer Zukunft ermöglichen, eine wiederholbar große Anzahl an Oozyten *in vitro* zu reifen und zu fertilisieren, um damit nach Zwischenkultur entwicklungsfähige Embryonen zu erlangen.

5.1 Steigerung der Zahl der Nachkommen weiblicher Tiere

5.1.1 Selektion und Zuchtwertschätzung

Durch die Anwendung des Embryotransfers konnte erstmals eine wesentliche Steigerung der Nachkommenzahl weiblicher Tiere erreicht werden. Hierbei ist die Superovulation jedoch nach wie vor der entscheidende limitierende Faktor. Etwa 30 % der ausgewählten Spenderkühe zeigen keine Reaktion auf die Hormonapplikation. Bei Tieren mit Fruchtbarkeitsstörungen sind die Erwartungen bezüglich der Reaktion und der Anzahl der Embryonen wesentlich niedriger anzusetzen (ELSDEN et al., 1979). Durch die Methode der *in vitro* Reifung von Oozyten könnten auch von Tieren, von denen mit herkömmlichen Methoden keine Embryonen zu gewinnen waren, zusätzliche Nachkommen erzeugt werden. Selbst nach Tod oder Schlachtung von Spitzentieren könnten durch Entnahme der Ovarien noch Oozyten gewonnen, *in vitro* gereift und fertilisiert werden. Hier bietet sich vor allem die Nutzung von Kühen mit hohen Lebens-

leistungen an. Solange die Eierstöcke noch aktiv sind und Tertiärfollikel bilden, ist kein negativer Einfluß des Alters der Tiere auf die Oozytenreifung zu erwarten.

Neben der besseren Nutzung des Fortpflanzungspotentials wertvoller Spendertiere könnte durch die Anwendung der in vitro Reifung von Oozyten die Selektionsintensität bei weiblichen Tieren erhöht werden. Würde man Oozyten eines Spendertieres getrennt mit unterschiedlichen Bullen fertilisieren, so stünde eine wesentlich höhere Anzahl mütterlicher Halbgeschwister für die Nachkommenprüfung zur Verfügung. Bei gleichzeitiger Verkürzung des Generationsintervalls käme dieser Methode in der Zuchtwertschätzung weiblicher Tiere somit eine Bedeutung zu. Ähnliche Modelle, wie sie für den Einsatz der Embryomikrochirurgie erstellt wurden (BREM, 1986) könnten hier Anwendung finden, sobald die hierfür erforderlichen Grunddaten aus Experimenten zur Verfügung stehen.

5.1.2 Erbfehlerdiagnostik

Der Embryotransfer hat in der Erbfehlerdiagnostik bereits einen entscheidenden Fortschritt gebracht. Die auf ein bestimmtes Merkmal zu testenden Bullen werden mit bekannten Anlageträgern bzw. Merkmalsträgern angepaart, die Embryonen gewonnen und von Empfängertieren ausgetragen. Die weiblichen Merkmalsträger stehen somit zur Prüfung weiterer Bullen zur Verfügung. Durch die Anpaarung an Merkmalsträger bzw. bekannte Anlagenträger bei gleichzeitig - bedingt durch die Superovulation - erhöhter Nachkommenzahl ist eine schnelle und sichere Diagnose möglich, ob ein Bulle Anlageträger eines Erbfehlers ist. Der Zeitfaktor spielt hierbei vor allem für den Einsatz in der künstlichen Besamung eine große Rolle (LEIPOLD, 1982; CHAVAZ et al., 1986).

Eine weitere Ausweitung dieser Art der Erbfehlerdiagnostik ist durch die in vitro Reifung von Oozyten möglich. Durch die höhere Anzahl an Embryonen könnten je nach Anzahl der benötigten Nachkommen mehrere Bullen gleichzeitig getestet werden. Ebenso ist eine Anwendung auf zu untersuchende weibliche Tiere möglich. Hierbei müsste das Sperma von bekannten Anlageträgern bzw. von Merkmalsträgern stammen.

5.1.3 Genreserven

Von enorm großer Bedeutung wäre eine Steigerung der Nachkommenzahl pro Spendertier für die Anlage von Genreserven. Durch die weite Verbreitung die einige wenige sehr leistungsfähige Rinderrassen erfahren haben, wurden zahlreiche weniger leistungsfähige Populationen weitgehend verdrängt. Die Dringlichkeit der Erhaltung einer größtmöglichen genetischen Variabilität wird mittlerweile allgemein anerkannt (MAIJALA, 1970). Zahlreiche Bestrebungen sind daher im Gange, solche Genreserven in Form von Embryobanken auf lange Sicht zu konservieren. Welche Bedeutung hierbei die *in vitro* Reifung von Oozyten spielen könnte, sei an Hand eines Beispiels demonstriert.

In einem derzeit laufenden Projekt zur Erhaltung der Rasse Murnau-Werdenfelser steht für die Errichtung einer Embryobank eine Population mit insgesamt 300 Tieren (150 Kühe) zur Verfügung. Bedingt durch Vorbehalte der Züchter gegenüber der Technik des Embryotransfers einerseits und mangelndem Fruchtbarkeitsstatus einer Reihe von Tieren andererseits standen für einen Zeitraum von 5 Jahren 13 Tiere für die Gewinnung von Embryonen zur Verfügung. Trotz mehrfacher Stimulierung einiger Spendertiere konnten insgesamt nur 89 Embryonen tiefgefroren werden (SPRINGMANN et al., 1986). Diese Anzahl an Embryonen würde für eine Mobilisierung dieser Genreserve nicht ausreichen.

Ausgehend von der geringen Anzahl an Spendertieren könnten unabhängig von einem hormonellen Stimulierungserfolg durch wiederholte Punktion kleiner Tertiärfollikel ein Vielfaches an Oozyten gewonnen werden. Zusätzlich könnten einige Tiere als Oozytenspender dienen, die auf Grund von Fruchtbarkeitsstörungen von der Stimulierung auszuschließen waren. Weiterhin wäre nach der Schlachtung die Gewinnung der Eierstöcke aller Tiere möglich, möglicherweise auch von den Tieren, deren Besitzer die Embryogewinnung ablehnten. Dadurch wäre gewährleistet, genetisches Material von Tieren unterschiedlicher Linien zu erhalten. Die Anwendung der *in vitro* Fertilisation würde darüberhinaus die Kombinationsmöglichkeit vermehren.

Durch die Anwendung der *in vitro* Reifung und *in vitro* Fertilisation ließe sich selbst bei sehr kleinen Populationen durch die bessere Nutzung des weiblichen Keimzellpotentials eine ausreichende Anzahl an Embryonen zur Anlage einer Embryobank gewinnen.

5.2 Fertilitätstest

Routinemäßige Untersuchungen des Ejakulats werden vor der Konservierung und dem Einsatz in der künstlichen Besamung regelmäßig durchgeführt. Hierbei spielen beispielsweise Kriterien wie Dichte, Motilität, Zellgehalt und Anteil mißgebildeter Spermien eine Rolle. Darüberhinaus werden Mindestanforderungen an die Überlebensrate beim Tiefgefriervorgang gestellt, ohne die zu erfüllen eine Spermacharge nicht in den Besamungseinsatz kommt.

Diese Untersuchungen gewährleisten zwar eine größtmögliche Qualität des konservierten Spermas, lassen jedoch keine Aussage über die Befruchtungsfähigkeit zu. Die Felddaten sind nur unzureichend verwertbar, da sie von einer unzähligen Fülle von Komponenten beeinflusst werden. Seit der elektronischen Datenerfassung in der künstlichen Besamung ist es möglich eine Beziehung zwischen dem jeweiligen Ejakulat eines Bullen und dem Befruchtungsergebnis herzustellen. Hierbei ist jedoch wiederum nur eine sehr eingeschränkte Aussage möglich, die zudem erst spät zur Verfügung steht (ZIEGLER, 1984).

IVF-Versuche beim Rind haben gezeigt, daß zwischen den Spermaproben verschiedener Bullen deutliche Unterschiede in den Fertilisationsraten bestehen (BRACKETT et al., 1982 a; SIRARD und LAMBERT, 1985; PARRISH et al., 1986). Es gilt nun zu untersuchen, ob diese Unterschiede bei der IVF im Zusammenhang mit Befruchtungsergebnissen im Besamungseinsatz stehen. Erste Hinweise hierfür gibt es bereits (CRITSER 1984, persönliche Mitteilung).

Die Information über die Befruchtungsfähigkeit von Bullensperma wäre ein weiteres wertvolles Selektionskriterium.

Als Anwendungsmöglichkeiten bieten sich an:

- Ergänzung der Zuchttauglichkeitsuntersuchung
- stichprobenartige Kontrollen während des Besamungseinsatzes
- laufende Qualitätskontrollen der einzelnen Ejakulate.

5.3 Praktische Anwendung der in vitro Fertilisation

Seit der ersten geglückten IVF beim Rind (BRACKETT et al., 1982 a) mehren sich die Berichte über Erfolge auf diesem Gebiet (siehe 2.4.4).

Nach Meinung von LAMBERT et al., 1986 ist der Einsatz in der Praxis mittlerweile möglich. Als limitierender Faktor ist jedoch bei den bisher beschriebenen IVF-Methoden die aufwendige chirurgische Gewinnung in vivo gereifter Oozyten zu sehen, deren Zahl wiederum vom Erfolg der Superovulation abhängig ist.

Bei der praktischen Anwendung der IVF stehen vor allem Fruchtbarkeitsstörungen im Vordergrund. Durch die Kombination von in vitro Reifung und IVF ist es möglich von besonders wertvollen Zuchttieren Nachkommen zu erhalten, die sich natürlicherweise nicht mehr fortpflanzen könnten bzw. bei denen die Anwendung von Superovulation bzw. die Spermagewinnung unbefriedigende Ergebnisse liefert.

Bei weiblichen Tieren kommen beispielsweise folgende Indikationen in Betracht:

- Erfolglose hormonelle Stimulierung
- Ausbleiben einer Fertilisation nach Superovulation
- Anatomische Veränderungen im Bereich des Genitaltraktes (z.B. Eileiterverklebungen)
- mangelhafter Spermientransport
- persistierende Infektionen.

Tiere mit erblich bedingten Fruchtbarkeitsstörungen sollten jedoch von einer Oozytengewinnung ausgeschlossen werden, um einer möglichen Kontraselektion vorzubeugen.

Eine mangelhafte Qualität des Ejakulates steht bei den männlichen Tieren im Vordergrund. Beispielsweise wären geringe Vorwärtsbeweglichkeit oder ein hoher Anteil mißgebildeter Spermien durch ein Anreicherungsverfahren, wie die 'sperm swim-up procedure' (PARRISH et al., 1985) kompensierbar.

Aus züchterischer Sicht wäre die Verfügbarkeit zahlreicher gleichaltriger väterlicher oder mütterlicher Halbgeschwister von Interesse.

Neben dem praktischen Einsatz der IVF kommt ihr vor allem in der Forschung Bedeutung zu. In fast allen Bereichen in denen in vitro gereifte Oozyten eine Anwendung finden könnten, müßte diese mit Methoden der IVF kombiniert werden, da vor allem Zygoten und frühe Embryonalstadien für die Grundlagenforschung benötigt werden.

5.4 Kryokonservierung von weiblichen Keimzellen

Die Kryokonservierung von Sperma ist bislang bei über 50 verschiedenen Spezies gelungen und findet vor allem beim Rind weltweit Anwendung (zur Übersicht siehe RENARD, 1984).

Ebenso wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, Embryonen tiefzufrieren. Dies gelang bisher bei 5 Haussäugetierspezies nämlich Rind, Schaf, Ziege, Kaninchen und Pferd (ebenda).

Über die Kryokonservierung unbefruchteter Eizellen liegen derzeit lediglich von Versuchstieren und vom Menschen Ergebnisse vor. Versuche bei der Maus und Kaninchen ergaben, daß durch Tiefgefrieren im flüssigen Stickstoff bei -196°C die Befruchtungs- und Entwicklungsfähigkeit von Oozyten erhalten bleibt (WHITTINGHAM, 1977; AL-HASANI et al., 1986). Versuche, die Oozyten von landwirtschaftlichen Nutztieren tiefzufrieren scheiterten bislang an einer fehlenden Erfolgskontrolle, die in der in vitro Fertilisation zu sehen ist. Diese Technik ist mittlerweile auch beim Rind verfügbar, sodaß umfangreiche Versuche in vitro gereifte Oozyten in flüssigen Stickstoff zu lagern dadurch möglich werden. Eine Konservierung im Stadium der meiotischen Ruhe wäre denkbar, die Gewinnung einer größeren Anzahl an Oozyten für die Tiefgefrierung daher ohne großen Aufwand durchführbar. Möglicherweise sind die Oozyten im Vergleich zu Embryonen weniger empfindlich gegenüber den verschiedenen Einflüssen, die durch die Konservierung auf sie einwirken. Bei Embryonen spielt z.B. die Qualität und das Stadium des Embryos zum Zeitpunkt des Einfrierens eine große Rolle (LEHN-JENSEN und GREVE, 1981). Die exakte Bestimmung des Stadiums der Oocyte wäre, falls dieses von Bedeutung wäre, sehr leicht möglich. Die Konservierung von Oozyten wäre eine wertvolle Methode bei der Anlage von Genreserven, da sie im Vergleich zur Gewinnung von Embryonen durch konventionelle Methoden, mit wesentlich geringerem Aufwand durchführbar wäre. Bei der Mobilisierung bestünden größere Variationsmöglichkeiten, da die Entscheidung über die Kombination der "Elterntiere" nach den jeweiligen Bedürfnissen ausgerichtet werden könnte.

5.5 Bereitstellung von Embryonen für die Forschung

Als Anwendungsmöglichkeit der *in vitro* Produktion von Rinderzygoten bieten sich zunächst alle Forschungsbereiche an, in denen bisher konventionell gewonnene Embryonen Verwendung fanden:

- weitere Untersuchungen zur Optimierung des Embryotransfers
- weitere Untersuchungen zur Kryokonservierung von Embryonen
- Erarbeitung geeigneter *in vitro* Kultursysteme für Rinderembryonen
- Untersuchung der frühen Embryonalentwicklung
- Geschlechtsbestimmung
- Erforschung von Mutagenen
- Untersuchung maternaler Effekte
- Mikrochirurgische Erzeugung von identischen Zwillingen oder Mehrlingen
- Erzeugung von Chimären
- Kerntransplantation
- Übertragung fremder DNA.

Darüber hinaus ermöglicht die *in vitro* Reifung von Eizellen die Erforschung von bzw. Einflußnahme auf Prozesse vor der Fertilisation:

- weitere Untersuchungen der Faktoren, die die Oozytenreifung beeinflussen
 - Erfassung der fertilisationsvorbereitenden Veränderungen am Spermium
 - Trennung von "X- und Y-Spermien" - gezielte Insemination
 - Bereitstellung von Empfängerzonae
- Embryotransfer

Bei bisherigen Untersuchungen zum Embryotransfer beim Rind waren sowohl die Gewinnung von Embryonen als auch die Anzahl der verfügbaren Empfängertiere limitierende Faktoren.

Durch die *in vitro* Produktion von Rinderzygoten stünden für verschiedene Fragestellungen eine große Anzahl an Embryonen zur Verfügung. Außerdem könnten vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Stadien von der Zygote bis zur Blastozyste durchgeführt werden, da es bei den beschriebenen *in vivo* Kultursystemen jederzeit möglich ist, die übertragenen Embryonen wiederzugewinnen. Durch Verwendung mehrerer

Empfängertiere sind bereits in diesem frühen Entwicklungsabschnitt vergleichende Untersuchungen möglich. Durch die *in vivo* Kultur in Schaf oder Kanincheneileitern ließe sich auch die Anzahl der benötigten Empfängertiere reduzieren, da durch diesen Zwischenschritt bereits eine Vorselektion möglich wird, so daß nur noch Embryonen bester Beurteilung endgültig übertragen würden. Für einige Fragestellungen, wie z.B. die Auswirkung bestimmter Arzneimittel, Chemikalien oder Mutagene auf Embryonen vor der Implantation könnte auch eine *in vivo* Kultur in artfremden Empfängern zur Klärung ausreichen.

- Kryokonservierung

Nämliches gilt für die Erprobung neuer Methoden der Kryokonservierung bzw. Optimierung gängiger Systeme. Es stünde a) ein umfangreiches Untersuchungsmaterial zur Verfügung und b) wären durch die Kombination mit der *in vivo* Kultur nach dem Auftauen schnellere Aussagen bezüglich der Überlebensrate und der Weiterentwicklung möglich.

- In vitro Kultur

Effiziente *in vitro* Kultursysteme für Säugerembryonen stehen in erster Linie für Embryonen der Versuchstierspezies zur Verfügung (BRINSTER, 1968). Als besonders erfolgreich erwies sich hier schon bei frühen Versuchen die Kultur von Mäuseembryonen (WHITTEN, 1970). Dahingegen verliefen die Versuche, Embryonen von Haussäugetieren zu kultivieren größtenteils unbefriedigend (zur Übersicht siehe WRIGHT und BONDOLI, 1981). Die Untersuchungen an Wiederkäuerembryonen erfolgten in der Regel an einer geringeren Anzahl an Embryonen als beispielsweise beim Schwein (ebenda).

Der große Aufwand der Gewinnung von Embryonen erschwert umfangreiche Versuche, vor allem aber zeitgleiche vergleichende Untersuchungen. Der Gewinnungsaufwand könnte durch die *in vitro* Produktion von Zygoten erheblich verringert werden, so daß dadurch zahlreichere und umfangreichere Untersuchungen möglich würden.

An Hand von *in vitro* oder *in vivo* Kultursystemen wären beim Rind Untersuchungen über die präimplantative Phase der Embryonalentwicklung möglich.

- Geschlechtsbestimmung

Ein seit langem erstrebtes Ziel der Tierzucht ist die Geschlechtsbestimmung und damit die gezielte Erzeugung von Nachkommen des erwünschten Geschlechts. Dieses Bestreben ist so alt wie die Tierzucht selbst. Die ersten Berichte stammen von dem griechischen Philosophen Democritus aus dem Jahre 55 vor Christi Geburt (BETTERIDGE, 1984). Zahlreiche Anstrengungen wurden seither diesbezüglich unternommen, jedoch ist dieses Ziel erst seit der Anwendung neuer Biotechniken wie z.B. des Embryotransfers oder der in vitro Fertilisation in Reichweite gelangt. Eine praxisreife Methode steht derzeit noch nicht zur Verfügung.

Grundsätzlich ist zu unterscheiden zwischen einer Praedetermination des Geschlechts und einer Geschlechtsdiagnose am Embryo.

Für eine Praedetermination kommen folgende Methoden in Betracht:

1. Trennung der X- bzw. Y-chromosomentragenden Spermien
 - aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten (SCHILLING und THORMÄHLEN, 1975)
 - durch Dichtegradientenzentrifugation (SCHILLING und THORMÄHLEN, 1976)
 - elektromagnetische Trennung (HARE und BETTERIDGE, 1978)
 - durch Sedimentation (SCHILLING, 1970)

2. Kerntransfer

3. Entfernung eines Vorkerns (siehe 5.5)

Bei der Diagnose des Geschlechts ist zu differenzieren nach:

1. Zytogenetischen Methoden (zur Übersicht siehe ROSCHLAU et al., 1983)
2. Nachweis des Geschlechtschromatins (zur Übersicht siehe HARE und BETTERIDGE, 1978)
3. Serologische Methoden (H-Y Antigen) (zur Übersicht siehe STOCKER und STRANZINGER; 1980)
4. Nachweis von Enzymen, die von x-chromosomalen Genen kodiert werden (WILLIAMS, 1986)

Sowohl was die Prædetermination des Geschlechts als auch die Diagnose an praeimplantiven Embryonen betrifft, werden durch die in vitro Reifung von Oozyten zahlreiche Möglichkeiten zur Erarbeitung praktischer Methoden eröffnet. Die gezielte Erzeugung von Kälbern eines Geschlechts für bestimmte Produktionsbereiche wäre aus tierzüchterischer und ökonomischer Sicht von großer Bedeutung.

Die Technik, durch in vitro Reifung und in vitro Fertilisation von Rinderoozyten eine große Anzahl an Embryonen zu erzeugen, würde auch durch die Bereitstellung dieser Embryonen für Bereiche der Mikromanipulation an Bedeutung gewinnen. Die Mikromanipulation von Embryonen spielt derzeit in der Forschung von Reproduktionsphysiologie und Tierzucht in zunehmendem Maße eine große Rolle.

- Mikrochirurgie

Bei der mikrochirurgischen Erzeugung von identischen Zwillingen wären umfangreichere vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Entwicklungsstadien möglich. Bei der Erzeugung von identischen Zwillingen mit herkömmlich gewonnenen Embryonen wurden von den einzelnen Arbeitsgruppen überwiegend Embryonen verwendet, die älter als 5 Tage waren (zur Übersicht siehe BREM, 1986). Durch die Teilung früher Embryonalstadien könnte analog der von WILLADSEN und POLGE (1981) beschriebenen Methoden die Entwicklungsfähigkeit der einzelnen Blastomeren zur Erzeugung indenterischer Mehrlinge genutzt werden. Der Aufwand der hierfür benötigten Zwischenkultur wird durch die Verwendung von Kaninchen als Empfängertiere auf ein Minimum beschränkt.

- Chimärismus

Die Grundlagen des experimentellen Chimärismus wurden bei den Säugtieren fast ausschließlich an der Maus untersucht. Darüberhinaus existieren einige Berichte von künstlich erstellten Chimären bei Schaf und Ziege (zur Übersicht siehe BREM, 1986). Bislang sind nur drei Arbeitsgruppen bekannt, denen die künstliche Erzeugung von Rinderchimären geglückt ist (SUMMERS et al., 1983; WILLADSEN 1984, persönliche Mitteilung, BREM et al., 1984). Die in vitro Produktion von Zygoten würde beim Rind in wesentlich größerem Umfang als bisher eine

grundlegende Erforschung des experimentellen Chimärismus ermöglichen. Hierbei wäre die Verfügbarkeit früher Embryonalstadien von großer Bedeutung, da bei der Aggregation früher Blastomeren die Wahrscheinlichkeit einer Chimärenbildung am größten ist (FEHILLY et al., 1984). Anwendung und Vergleich verschiedener Methoden der Chimärenenerzeugung wären ebenfalls in größerem Umfang möglich.

Die Anwendungsmöglichkeiten des experimentell induzierten Chimärismus sind vor allem in den Bereichen der Forschung zahlreich. Hier sei nur eine erwähnt, die unter Umständen aus ökologischer Sicht große Bedeutung gewinnen konnte. Der interspezifische Embryotransfer scheitert häufig in einer frühen Phase der Gravidität durch eine Abstoßungsreaktion seitens des Empfängertieres (WARWICK und BERRY, 1949; FEHILLY et al., 1984; DAHLHAUSEN 1984, persönliche Mitteilung). Gerade der interspezifische Embryotransfer wäre jedoch ein wertvolles Instrument zur Erhaltung und Vermehrung gefährdeter Arten. Bei Tieren, die sich in Gefangenschaft nicht fortpflanzen, stößt der Embryotransfer durch Mangel an geeigneten Empfängertieren sehr schnell an Grenzen. Könnte man nun die Forschung an Rinderchimären so weit fortführen, daß es gelänge mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit vorherzubestimmen, welcher der beteiligten Embryonen den Trophoblasten bildet, so könnte man auf diese Art und Weise Rinder als Empfänger für eine Reihe anderer nahe verwandter Spezies benützen. Zur Übertragung kämen hierbei Chimären deren Innere Zellmasse aus dem Embryo der gefährdeten Spezies gebildet wurde, den Trophoblasten hingegen von einem Rinderembryo erhielten, wodurch die Abstoßung verhindert würde (FEHILLY et al., 1984).

- Kerntransfer

Methoden des Kerntransfers wurden vor allem bei der Maus erarbeitet (MC GRATH und SOLTER, 1983; ROBL und FIRST, 1985). Erste Versuche wurden auch für das Schaf (WILLADSEN, 1986) und das Rind beschrieben (ROBL et al., 1986). Der Kerntransfer wäre vor allem für die Erstellung von Klonen von Bedeutung. Hier würde sich zum einen der Transfer von embryonalen Zellkernen anbieten, wobei dafür nur eine sehr beschränkte Anzahl genetisch identischer Kerne zur Verfügung stünde. Zur Bildung von Klonen einer großen Individuenzahl, wie sie aus der Pflanzenzucht bekannt sind, wäre der Transfer von somatischen Zellkernen erforderlich, was in absehbarer Zukunft nicht möglich erscheint (MC GRATH und SOLTER, 1983).

Die Technik des Kerntransfers wäre eine Grundvoraussetzung zur Erforschung der extrachromosomalen Vererbung, da hierdurch erstmals eine Unterscheidung zwischen chromosomalen Erbfaktoren und zytoplasmatischen Effekten wie z.B. mitochondrialer DNA möglich würde.

Die in vitro Produktion von Zygoten wäre besonders für den Pronucleus-Transfer von Bedeutung. Ausschlaggebend ist wiederum, daß durch diese Methode zu jedem beliebigen Zeitpunkt eine große Anzahl von fertilisierten Oozyten eines definierten Stadiums verfügbar sind. Durch einen Transfer von Vorkernen wäre eine Kombination aus zwei weiblichen (Gynogenese) oder zwei männlichen Vorkernen (Androgenese) denkbar. Trotz zahlreicher Versuche bei der Maus, ist es bislang nicht gelungen, aus solchen Experimenten, lebende Junge zu erhalten. Eine eingeschränkte Entwicklung, teilweise sogar die Implantation sind möglich, jedoch sind für die vollständige Entwicklung beim Säugetier Erbinformationen sowohl von der väterlichen als auch von der mütterlichen Seite nötig (MC GRATH und SOLTER, 1984).

Die künstliche Erstellung homozygoter Tiere wäre durch Entfernung eines Vorkernes und durch Diploidisierung des Verbleibenden möglich. Bis auf ein mittlerweile sehr umstrittenes Experiment (HOPPE und ILLMENSEE, 1977) ist dies bislang nicht gelungen. Die künstliche Produktion homozygoter Tiere wäre vor allem in der Tierzucht von großer Bedeutung. Mit Hilfe eines experimentell induzierten Chimärismus sollte es allerdings möglich sein, die oben genannten defekten Embryonen zu retten. Bei einer zufälligen Integration dieser Embryonen in die Keimbahn des neuen Individuums wäre dann eine Vermehrung möglich (MARKERT, 1984).

Die Basis für eine umfangreiche Forschung in dieser Richtung ist durch die in vitro Produktion von Zygoten auch beim Rind gegeben.

- Gentransfer

Das Einbringen fremder DNA in die Keimbahn von Säugetieren - der sog. Gentransfer - ist neuerdings für zahlreiche Forschungsgruppen in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Die in vitro Produktion von Rinderzygoten wäre vor allem für die Mikroinjektion dieser DNA in Vorkerne von Zygoten oder in Kerne von 2-Zellern von Bedeutung. Die Mikroin-

jektion ist eine von bislang 3 erfolgreichen Methoden des Gentransfers bei Säugetieren (zur Übersicht siehe SEIDEL, 1983; MARKERT, 1984; BREM, 1986). Je nach verwendetem Genkonstrukt ist die Überprüfung von Integration und Expression dieser DNA bereits an frühen Embryonalstadien möglich (FIRST 1984, persönliche Mitteilung).

Denkbare Anwendungsmöglichkeiten molekularbiologischer Methoden in der Tierzucht sind nach KRÄUBLICH (1985) folgende:

- a) Analyse des Genoms und Nutzung der Ergebnisse für Selektion und Paarung
- b) Unterdrückung unerwünschter Gene
- c) Erstellung transgener Nutztiere

- Untersuchungen an Keimzellen vor der Fertilisation

Die *in vitro* Reifung von Oozyten ermöglicht neben der Bereitstellung von Embryonen auch umfangreiche Untersuchungen an Gameten vor der Fertilisation. Wenn es gelingt, einen hohen Prozentsatz der inkubierten Oozyten vollständig *in vitro* zu reifen, steht damit ausreichend Material zur Verfügung, um die Faktoren, die die Oozytenreifung beeinflussen noch eingehender zu untersuchen. Hier bietet sich an, den zeitlichen Ablauf der zytoplasmatischen Veränderungen näher zu beleuchten, um somit über das Erkennen kritischer Phasen die Reifungsbedingungen *in vitro* noch besser natürlichen Bedingungen innerhalb des Follikels anzupassen. Darüberhinaus gilt es zu untersuchen, ob der entscheidende Einfluß, den die Follikelzellen im Reifungsprozess der Oozyten spielen, auf regulativen Funktionen oder mehr auf der Bereitstellung spezifischer Substrate basiert.

Analog wächst mit der Verfügbarkeit fertilisierbarer Oozyten die Möglichkeit, verschiedene Faktoren der Spermienkapazitation und Fertilisation beim Rind zu untersuchen. Bereits BRACKETT (1983) weist auf die enge Verknüpfung zwischen *in vitro* Fertilisationsstudien und der *in vitro* Reifung von Rinderootzyten hin. Zahlreiche Untersuchungen, die grundlegend für nachfolgende *in vitro* Fertilisationsexperimente an *in vivo* gereiften Oozyten waren, wurden an *in vitro* gereiften Oozyten durchgeführt (BRACKETT et al., 1980; BALL et al., 1983; LENZ et al., 1983; CRITSER et al., 1984; PARRISH et al., 1985, 1986). Jedoch ist für eine endgültige Beurteilung des Fertilisationserfolges auch die

Weiterentwicklung der Embryonen ein wichtiges Kriterium. Hierfür gilt es, Oozyten zu verwenden, die sowohl die Meiose vollendet als auch zytoplasmatische Reifungsprozesse abgeschlossen haben.

Als letzte der zahlreichen Möglichkeiten, in vitro gereifte Oozyten zu nutzen, sei noch die Bereitstellung von Empfängerzonae genannt. Nach vollständiger Denudierung und mikrochirurgischer Entfernung des Zytoplasmas kann die Zona pellucida solcher Oozyten als Empfänger für mikromanipulierte Embryonen dienen. Eine Konservierung der Zona ist durch Tiefgefrieren problemlos möglich.

6. DISKUSSION

6.1 Oozytengewinnung

Bei der Gewinnung von Schlachtovarien fällt eine verhältnismäßig hohe Ausfallsquote von 33,7 % auf. Mit 15,2 % (43,5 %) sind Veränderungen am Ovar der häufigste Grund für einen Ausschluß vom Versuchsmaterial. Diese Zahl erscheint zunächst sehr hoch, relativiert sich aber bei näherer Betrachtung. Die Daten wurden vorwiegend am Schlachthof München am Tag des Großviehmarktes erhoben. An diesem Tag werden größtenteils weibliche Tiere lebend vermarktet, die aus der umliegenden Region zur Schlachtung nach München gebracht werden. Es handelt sich also zu einem überwiegenden Teil um Tiere, die aus diversen Gründen aus Zucht und Milchproduktion ausscheiden. Tiere aus der Färsen- und Bullenmast kommen hauptsächlich an den übrigen Wochentagen zur Schlachtung. Fruchtbarkeitsstörungen belasten die Statistik der Abgangsursachen beim Fleckvieh mit 28,2 % (Jahresbericht des LKV Bayern, 1985). Somit ist ein Anteil von 15,2 % der Tiere, die Veränderungen am Ovar aufweisen in dieser spezifischen Situation durchaus zu erwarten.

In den vorliegenden Experimenten wurden Ovarien von graviden Tieren vom Versuchsmaterial ausgeschlossen. Da jedoch Tertiärfollikel einer Größe zwischen 2 und 5 mm unabhängig vom Zyklusstand und auch während der Gravidität auf dem Ovar vorhanden sind, könnten auch diese Ovarien zur Oozytengewinnung herangezogen werden.

Die Zahlen der Ovarien, die beim Ausweiden am Tierkörper verbleiben, variieren je nach Metzger sehr stark. Durch größere Sorgfalt ließen sich diese Ausfälle problemlos vermeiden.

Bei einer Schlachtkapazität von 100 - 120 Stück Großvieh/h am Münchner Schlachthof spielt ein Ausfall von 33,7 % der Tiere keine große Rolle, vorausgesetzt es werden überwiegend weibliche Tiere geschlachtet. An weniger mechanisierten Schlachtstätten vergeht jedoch für einen umfangreichen Versuchsansatz wesentlich mehr Zeit zwischen der Gewinnung der ersten und letzten Ovarien, so daß kein einheitliches Versuchsmaterial gewonnen werden kann.

Ein Vergleich des Inkubationsbeginns 1 bzw. 2 h nach der Schlachtung ergab keinen Unterschied in der Reifung (SHEA et al., 1976). Die meisten Autoren vertreten jedoch die Meinung, daß der Zeitraum zwischen Schlachtung und Inkubationsbeginn möglichst kurz sein sollte.

Eine Gewinnungsrate von ca. 50 % der Oozyten bezogen auf die Anzahl der

punktierten Follikel entspricht den Angaben von LEIBFRIED und FIRST (1979 b). Diese Zahl läßt sich durch Anwendung eines Punktionsautomaten wesentlich erhöhen. Hierbei ist auch von Bedeutung, daß dabei ein höherer Anteil der Oozyten einen kompakten unverletzten Cumulus aufweist. Durch das Absaugen der Follikel mit einer Spritze läßt sich der Unterdruck nicht regulieren und dieser liegt vermutlich weit über dem des Automaten. Dadurch kommt es zu einer mechanischen Schädigung des Cumuluszellverbandes. Der Punktion mit Hilfe eines Punktionsgerätes ist daher der Vorzug zu geben.

Bei der Verwendung von Schlachtovarien ist diese Höhe der Gewinnungsrate ausreichend, solange die Herkunft der Oozyten keine Rolle spielt. Soll jedoch eine gezielte Gewinnung der Oozyten bestimmter Tiere, oder die chirurgische Oozytengewinnung am lebenden Tier erfolgen, so müßte die Oozytenausbeute deutlich erhöht werden.

Denkbar wäre eine Vorrichtung am Punktionsgerät, die eine zusätzliche Spülung des Follikels erlaubt, um damit auch Oozyten zu gewinnen, die der Follikelwand anhaften. Um zu verhindern, daß die Flüssigkeit punktierter Follikel vorzeitig entweicht, sollte die Punktionskanüle schräg durch das Ovargewebe in den Follikel eingestochen werden und nicht sagittal auf die Follikeloberfläche treffen.

Durch eine zusätzliche Zentrifugation der Follikelflüssigkeit konnten zwar nach einer ersten Entnahme des Sediments noch einige Oozyten gefunden werden, grundsätzlich ist jedoch davon abzuraten, da dadurch auch Zellpartikel, die nach 15minütiger Sedimentation noch nicht abgesunken sind in das Sediment gelangen und dadurch das Auffinden der Oozyten erschwert und verzögert wird.

Der relative Anteil an Oozyten mit lebendem Cumulus oophorus bleibt vermutlich auch bei einer höheren Gewinnungsrate konstant. Dies ist durch das Fließgleichgewicht der Follikelbildung zu erklären (siehe 2.1). Ständig verlassen Follikel den sog. Wachstumspool und werden atretisch. Für die Dauer des fortpflanzungsfähigen Lebens eines Individuums erfolgt eine Kompensation durch heranwachsende Follikel, die in den Wachstumspool eingehen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß Schlachtovarien eine geeignete Quelle darstellen, um eine hohe Anzahl von Oozyten für die in vitro Reifung zu gewinnen. Ebenso ist eine Gewinnung von Graaf'schen Follikeln für den Ansatz von Granulosazellkulturen auf diese Art und Weise möglich.

6.2 In vitro Reifung und in vitro Fertilisation von Rinderoozyten

Entfernt man Oozyten aus kleinen Tertiärfollikeln, in denen sie sich normalerweise im Germinalvesikelstadium befinden, so reifen sie in definierten Kulturmedien zu einem hohen Prozentsatz bis zur Metaphase II der Meiose. Mäuseoozyten vollenden die Meiose sogar, wenn sie in physiologischer Kochsalzlösung inkubiert werden (EDWARDS, 1962). Rinderoozyten stellen zum Erreichen der Metaphase II der Meiose höhere Ansprüche an das Kulturmedium (siehe 2.3). In den vorliegenden Versuchen wird dies durch die Kontrollinkubation in PBS-Lösung deutlich. Der Bruch des Germinalvesikels tritt zwar noch auf, aber eine weitere Fortsetzung der Meiose stellt die Ausnahme dar. Dies deutet darauf hin, daß durch die Entfernung der Oocyte aus dem Follikel ein hemmender Einfluß entfällt, was die Auflösung des Germinalvesikels bewirkt. Für die Vollendung der Meiose sind jedoch spezifische Eigenschaften des umgebenden Milieus ausschlaggebend.

In den vorliegenden Versuchen konnte durch die Reifung der Oozyten in Cokultur mit Granulosazellen im Vergleich zur Inkubation in anderen Medien eine Verbesserung der Meioseerate erreicht werden ($p < 0,05$). Durch Inkubation in Follikelflüssigkeit aus Graaf'schen Follikeln konnten zwar ähnlich hohe Reifungsergebnisse wie in TL-Medium erzielt werden, die Ergebnisse unterlagen jedoch starken Schwankungen (0 - 80 %). Dies läßt einen Rückschluß auf den Status des jeweiligen Follikels zu. Da die Qualitätsbestimmung des Follikels jedoch eines großen Aufwands bedarf, ist die Inkubation in Follikelflüssigkeit ungeeignet zur Reifung großer Zahlen an Oozyten. Die Flüssigkeit aus kleinen Tertiärfollikeln ist erwartungsgemäß ein ungeeignetes Inkubationsmedium. Die Ergebnisse der Reifung in FCS entsprechen denen von TROUNSON et al. (1977).

In der Folge zahlreicher grundlegender Untersuchungen (vgl. 2.2 und 2.3) ist es gelungen, die Reifungsbedingungen dahingehend zu optimieren, daß ein wiederholbar hoher Anteil der inkubierten Oozyten die Meiose in vitro vollendet (CRITSER et al., 1986; LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1986; Tabelle 6). Dieser Prozentsatz wird sich kaum nennenswert steigern lassen, bedenkt man, daß trotz Vorselektion immer ein gewisser Teil der inkubierten Oozyten die Voraussetzung zur Reifung nicht mitbringt (siehe 2.1). Höhere Zahlen (95 - 100 %) wie sie z. B. von THIBAULT et al. (1975) erreicht wurden widersprechen dem nicht. In diesen Experimenten wurden praepubertale Kälber hormonell stimuliert,

um die Bildung von Tertiärfoollikeln anzuregen. Dabei kann man davon ausgehen, daß bei diesen Tieren der kontinuierliche Prozess von Follikelwachstum und -Atresie noch nicht in Gang gekommen ist.

Untersuchungen *in vivo* gereifter Rinderoozyten haben ergeben, daß innerhalb von 8 h nach LH-Ausschüttung der Bruch des Germinalvesikels erfolgt. In einem Zeitraum zwischen 19 h nach der LH-Ausschüttung und der Ovulation erfolgt die Ausbildung des Polkörperchens (KRUIP et al., 1983). Eine Inkubationsdauer von 24 Stunden ist daher nötig, um eine möglichst große Anzahl an Oozyten zu reifen. Eine längere Inkubation bringt keine wesentliche Verbesserung der Meiose (vgl. 2.3) und erhöht die Gefahr des Alterns der Oocyte.

In engem Zusammenhang mit der Meiose, zumindest was den zeitlichen Ablauf betrifft, steht die Expansion des Cumulus oophorus. Auch hier konnten bei den Kontrolloozyten keine deutlichen Veränderungen am Cumuluszellverband festgestellt werden, wohingegen bei der Reifung in Kulturmedien der Anteil expandierter Oozyten dem Anteil der Oozyten entspricht, die die Meiose *in vitro* vollendet haben.

In vivo ist die Expansion der Cumuluszellen als Antwort auf die Gonadotropinausschüttung zu betrachten. Einhergehend mit der Expansion kommt es zu einer Lösung der interzellulären Verbindungen und der Verbindung zwischen Oocyte und Cumuluszellen (vgl. 2.1). Beim Rind hat hier FSH einen entscheidenden Einfluß. Auch bei *in vitro* Experimenten konnte der positive Einfluß von FSH demonstriert werden (HENSLEIGH und HUNTER, 1983).

Expandierte Cumuluszellen produzieren Glucosaminoglycane (BALL et al., 1984). Diese wiederum spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Fertilisation, indem sie die Akrosomenreaktion der Spermien induzieren (LENZ et al., 1983). *In vivo* gereifte Oozyten mit expandiertem Cumulus weisen deutlich höhere Fertilisationsraten auf (LAMBERT et al., 1986). Diese Erkenntnisse lassen den Schluß zu, daß expandierte Cumuluszellen auch für die *in vitro* Fertilisation von großer Bedeutung sind.

In vitro gereifte Oozyten zeigen nach Coinkubation mit aufbereitetem Rindersperma eindeutige Anzeichen einer Fertilisation (Tabellen 7 und 8; BALL et al., 1983; IRITANI et al., 1984). Die Fertilisationsraten unterschieden sich bei vergleichenden Untersuchungen nicht von denen *in vivo* gereifter, *in vitro* fertilisierter Oozyten, jedoch war der Anteil ausgebildeter männlicher Vorkerne bei *in vitro* gereiften Oozyten deutlich geringer (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1986).

In den vorliegenden Untersuchungen lag der Anteil in TL-Medium gereifter Oozyten, die beide Vorkerne ausbildeten bei nur 52,1 %. Dies deckt sich mit Untersuchungen von FULKA et al. (1982) und BALL et al. (1983 und 1984). Hierfür ist vermutlich das Fehlen eines zytoplasmatischen Faktors in der Oozyte, des sog. 'Male Pronuclear Growth Factors' (MPGF) verantwortlich, der die Dekondensation des Spermienkopfes bewirkt und bei der in vitro Reifung bei vielen Oozyten nicht ausgebildet wird (THIBAUT et al., 1975).

Die Ausbildung des MPGF ist Bestandteil der Zytoplasmareifung der Oozyten, und wird von mehreren, noch unbekannten Faktoren beeinflusst. Die Fähigkeit der Oozyte, den Spermienkopf zu dekondensieren wird in vivo während der gonadotropinstimulierten 1. meiotischen Teilung erlangt (IWAMATSU und CHANG, 1972; NIWA und CHANG, 1975). Untersuchungen an Mäuseoozyten ergaben, daß nur Zytoplasma, das durch den Bruch des Germinalvesikels mit Karyoplasma Kontakt hatte, fähig ist den männlichen Vorkern auszubilden.

Die Ausbildung des männlichen Vorkerns erfolgt bei in vitro gereiften Oozyten später als bei in vivo gereiften. Außerdem befinden sich noch Reste kondensierter Granula im Vorkern. Diese Abweichungen bei der Fertilisation könnten eine der Ursachen der eingeschränkten Entwicklungsfähigkeit dieser Oozyten sein (THIBAUT, 1977).

Ein geringer Anteil der in vitro gereiften und in vitro fertilisierten Oozyten wies bei der Beurteilung 24 h nach Fertilisationsbeginn mehrere Kerne auf. Dieses Phänomen könnte auf die Penetration mehrerer Spermien zurückzuführen sein. Diese Beobachtung deckt sich mit Berichten von KING et al. (1985), die beschrieben, daß polysperme Zygoten mehrere deutliche Vorkerne ausbilden können, die unterschiedlich groß sind. Polyspermie trat auch in anderen Experimenten mit in vitro gereiften Rinderoozyten auf (FULKA et al., 1982; BALL et al., 1983). Polyspermie ist in vivo nur äußerst selten zu beobachten (MEINECKE-TILLMANN und MEINECKE, 1980).

Die Ursache für das gehäufte Auftreten von Polyspermie bei in vitro gereiften Oozyten ist in einer mangelhaften Rindenreaktion zu sehen. Während einer physiologischen Reifung kommt es zu einer Aufreihung corticaler Granula in unmittelbarer Nähe der Basalmembran. Diese Granula verhindern das Eindringen überzähliger Spermien (vgl. 2.1).

Die Ergebnisse der vielen Versuche, Oozyten in herkömmlichen Kulturmedien zu reifen, deuten darauf hin, daß diese Reifung ein komplexer Vorgang ist, der aus zwei Hauptbestandteilen besteht, nämlich aus Veränderungen des Kerns zum einen und Veränderungen des Zytoplasmas zum anderen. Nur die Kombination aus Kernreifung und Zytoplasmareifung ermöglicht eine physiologische Fertilisation und in der Folge eine normale Embryonalentwicklung.

Die Inkubation in Kulturmedien unter Abwesenheit jeglicher follikulärer Elemente beeinträchtigt vermutlich in erster Linie die zytoplasmatischen Veränderungen. Der Grund hierfür kann sowohl im Fehlen regulativer Faktoren als auch in einer mangelhaften Zusammensetzung dieser Medien bezüglich eines spezifischen Hormonprofils oder Substratangebots liegen.

Die enge Verknüpfung der vollständigen Oozytenreifung mit Bestandteilen des Follikels wird deutlich, wenn man zum Vergleich die Ergebnisse von Untersuchungen heranzieht, bei denen präparierte Follikel in-toto in vitro inkubiert wurden. Durch die Kultur explantierter Follikel lassen sich Bedingungen für eine physiologische Oozytenreifung auch in vitro nachvollziehen (THIBAUT et al., 1975; MOOR und TROUNSON, 1977). Eine Nutzung dieser Methode zur Reifung von Rinderoozyten in vitro scheidet jedoch aus, da hier eine sehr aufwendige Präparation einzelner Follikel nötig ist, wodurch die zahlenmäßige Ausbeute sehr limitiert bleibt.

Die Erkenntnis über die Bedeutung des Follikels für die Oozytenreifung war ausschlaggebend für Experimente, bei denen Oozyten zusammen mit Bestandteilen des Follikels kultiviert wurden. Hierzu wurden die den Follikel auskleidenden Zellen gewonnen.

Zunächst wurde ein deutlich positiver Effekt auf die Fertilisierbarkeit von Kaninchenoozyten beobachtet (FULKA und MOTLIK, 1980). Schließlich gelang es STAIGMILLER und MOOR (1984) Schafoozyten durch Cokultur mit Granulosazellen unter Zugabe von Steroiden und Gonadotropinen vollständig zu reifen. Die Cokultur wurde dabei in einem nichtstatischen System durchgeführt.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden Oozyten zusammen mit Granulosazellen in einem statischen System inkubiert. Hierdurch konnte eine deutliche Verbesserung der Fertilisationsrate erreicht werden ($p < 0,05$). Vor allem fiel jedoch auf, daß wesentlich mehr Oozyten sowohl einen männlichen als auch einen weiblichen Vorkern ausbildeten ($p < 0,001$).

Auch der Anteil der Oozyten, die bereits 24 h nach Fertilisationsbeginn die erste Teilung vollzogen hatten, lag höher als bei den in TL-Medium gereiften Oozyten ($p < 0,01$). Nach Beobachtungen von HUNTER et al. (1972) kann die erste Teilung bereits 16 h nach der Spermienpenetration auftreten. In diesem Fall verbliebe bei 24 stündiger Inkubation in Fertilisationstropfen ein Zeitraum von 8 h für die Spermienkapazität, was völlig ausreichend sein dürfte.

Die oben genannten Ergebnisse deuten darauf hin, daß durch die Kokultur mit Granulosazellen im Vergleich zur Reifung in TL-Medium die Zytoplasmareifung eine entscheidende Verbesserung erfährt. Die Fähigkeit, den Spermienkopf zu dekondensieren ist eine Eigenschaft des Zytoplasmas, die erst im Zuge eines physiologischen Reifungsprozesses erlangt wird.

Ein Bestandteil dieser zytoplasmatischen Reifungsvorgänge sind Veränderungen in der Proteinsynthese.

In vivo gereifte Schafoozyten weisen zu verschiedenen Zeiten nach dem LH-Peak deutliche Veränderungen im Synthesemuster der Proteine auf, während bei extrafollikulär gereiften Oozyten diese Veränderungen nicht beobachtet werden können (MOOR und WARNES, 1978). Der entscheidende Anstoß für diese Proteinveränderungen ist vermutlich ein Transkriptionsvorgang zu Beginn der Reifung. Dies konnte experimentell durch Zugabe von α -Amanitin zu Oozytenkulturen nachgewiesen werden. α -Amanitin, welches einen hemmenden Einfluß auf die RNA-Synthese hat, zeigt bei der Oozytenreifung eine zeitlich sehr begrenzte Wirkung zu Beginn der Reifung (OSBORN und MOOR, 1983).

Bislang konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob diese Proteinveränderungen per se ausschlaggebend für eine vollständige Reifung und damit für eine physiologische Fertilisation und Embryonalentwicklung verantwortlich sind.

Ebenfalls von Bedeutung scheint in einer relativ kurzen Phase zu Beginn der Reifung das Steroidhormonprofil zu sein. Möglicherweise ist der entscheidende Einfluß des Follikels bzw. der Follikelzellen dieser Phase zuzuschreiben. In ultrastrukturellen Untersuchungen an in vivo gereiften Oozyten verschiedener Stadien unterscheiden KRUIP et al. (1983) zwischen einer solchen follikelabhängigen induktiven Periode, die gekennzeichnet ist durch hohe Steroidkonzentrationen, und einer follikelunabhängigen synthetisierenden Periode, die einhergeht mit niedrigeren Steroidkonzentration. Charakteristisch ist hierbei ein

Abfall der anfänglich hohen Östradiolkonzentrationen und ein Anstieg der Progesteronwerte kurz vor der Ovulation. Die Veränderungen zwischen diesen beiden Perioden sind gekennzeichnet durch eine deutliche Umverteilung der Organellen innerhalb des Zytoplasmas. Auffällig sind vor allem Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum, die sich zusammen mit Lipidgranula zu metabolischen Einheiten anordnen. Möglicherweise wird hier durch die Mitochondrien die Energie bereitgestellt, die für eine intensive Proteinsynthese benötigt wird.

Denkbar wäre, daß diese ultrastrukturellen Veränderungen den Verknüpfungspunkt zwischen charakteristischem Hormonprofil des reifenden Follikels und dem spezifischem Proteinsynthesemuster der Oozyte darstellen.

Neben Hormonen könnten auch nichthormonelle Substanzen einen Einfluß auf die Proteinsynthese besitzen. SCHWEIGERT et al. (1986) konnten erstmals nachweisen, daß eine nichthormonelle Substanz, nämlich Vitamin A, eine deutliche Abhängigkeit von der Follikelqualität und damit weitgehendst auch von der Follikelgröße aufweist (Abbildung 9). Dieses Verhalten konnte bislang nur bei Hormonen beobachtet werden. Darüberhinaus konnte festgestellt werden, daß hohe Vitamin A Konzentrationen fast immer mit hohen intrafollikulären 17- β -Östradiol Konzentrationen verbunden waren (SCHWEIGERT, 1986, in Vorbereitung). Atretische und zystös veränderte Follikel weisen dagegen deutlich niedrigere Vitamin A Konzentrationen auf. Dies deutet auf einen Zusammenhang mit der Stoffwechselaktivität der Granulosazellen hin. Möglicherweise ist ein carotinspaltendes Enzym für diesen Anstieg von Vitamin A verantwortlich.

Ein denkbarer Wirkungsmechanismus von Vitamin A ist ein Eingriff in die Synthese der m-RNS und damit in die Regulation der Proteinbiosynthese (WOLF, 1984). Damit ließe sich ein Zusammenhang herstellen zwischen den für die Oozytenreifung so bedeutsamen Proteinveränderungen und der hohen Konzentration an Vitamin A in den vermutlich zur Ovulation bestimmten Follikeln.

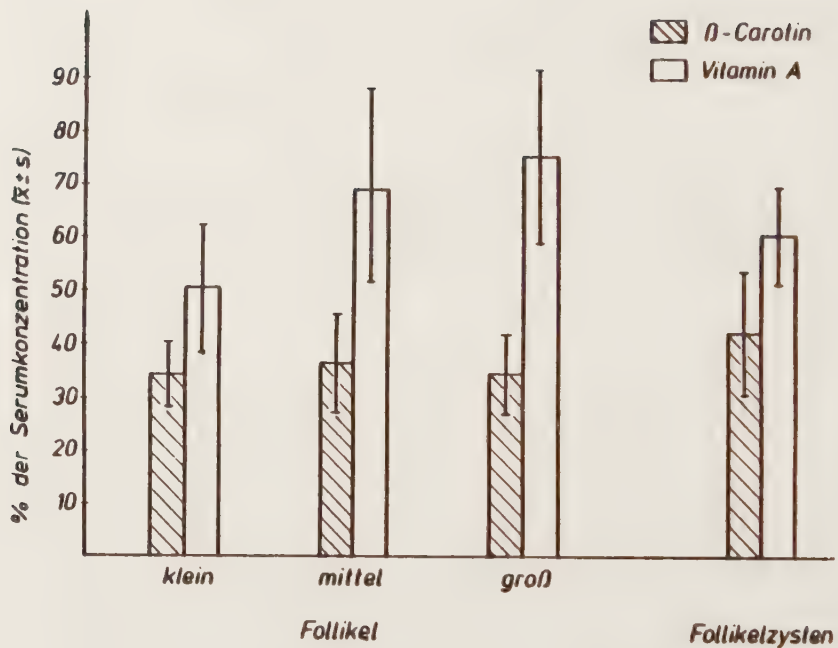


Abbildung 9: Konzentration von Vitamin A und β -Carotin in Follikeln verschiedener Größen und Follikelzysten nach SCHWEIGERT et al., 1986

In den vorliegenden Versuchen erbrachte die Zugabe von Vitamin A in physiologischer Konzentration keine nennenswerte Verbesserung der Reifungs- und Fertilisationsergebnisse. Die Zugabe von kleinen Mengen Äthanol hatte keinen negativen Einfluß auf die Kulturen. Die Zugabe von Serumlipoproteinen erfolgte auf Grund von Untersuchungen, die bei der Ratte durchgeführt wurden. Cholesterin ist ein wichtiges Substrat für die Bildung von Steroiden durch Granulosazellen. In vitro

Versuche ergaben, daß nur an Lipoproteine gebundenes Cholesterin verwertet werden kann und zu einem Anstieg der Steroidsynthese führt (STRAUB et al., 1981). In den Granulosakulturen der hier beschriebenen Experimente konnte durch das Angebot von Lipoprotein-gebundenem Cholesterin keine nennenswerte Steigerung der Steroidsynthese erreicht werden.

Die Anzahl der untersuchten Oozyten war jedoch sowohl bei der Zugabe von Vitamin A als auch von Serumlipoproteinen zu gering, um eine endgültige Aussage zuzulassen. Weitere Untersuchungen sollen folgen.

6.3 Kultur fertilisierter Oozyten

In vitro gereifte und in vitro fertilisierte Rinderoozyten entwickeln sich in vitro nur zu einem äußerst geringen Prozentsatz weiter (siehe 4.2.1 und 4.2.3, Tabelle 9, BALL et al., 1984; HENSLEIGH und HUNTER, 1985). Die Entwicklung geht dabei bei der Mehrzahl der Oozyten nicht über das 2-Zellstadium hinaus. Dies liegt einerseits in einer mangelhaften Reifung und unphysiologischen Fertilisation der Oozyten begründet. Andererseits weisen auch in vivo gereifte, in vitro fertilisierte Rinderoozyten eine sehr eingeschränkte Weiterentwicklung auf, wenn sie in vitro kultiviert werden (LAMBERT et al., 1986). Vor allem die erste embryonale Teilung erfordert ein ganz spezifisches umgebendes Milieu (BRACKETT, 1983). Viele Säugetierembryonen zeigen in vitro eine Entwicklungshemmung, die bei verschiedenen Spezies in jeweils für diese Spezies spezifischen Entwicklungsstadien auftritt. Beim Rind wird diese Hemmung im 8-Zellstadium wirksam (CAMOUS et al., 1984; EYESTONE und FIRST, 1986).

Die Teilungsraten nach in vitro Kultur lassen daher keinen eindeutigen Rückschluß auf die Qualität der in vitro Reifung und die Fertilisationsrate zu.

Die im I. Versuchsansatz gewählte Methode, Reifung und Fertilisation an Hand der Teilungsraten nach in vitro Kultur zu beurteilen, ist daher ungeeignet. Vielmehr muß die Beurteilung in Teilabschnitte untergliedert werden, um eine Aussage zu ermöglichen. Eine Unterscheidung zwischen einer Teilung nach Fertilisation einerseits und parthenogenetischer Teilung andererseits war in diesem Versuchsabschnitt ebenfalls nicht möglich.

Eine deutliche Verbesserung der Kulturergebnisse kann durch in vivo Kultur in Eileitern von Schafen oder Kaninchen erreicht werden. Dies gilt für herkömmlich gewonnene Embryonen (LAWSON et al., 1972), für in vivo gereifte und in vitro fertilisierte Oozyten (LAMBERT et al., 1986; LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1986) und auch für in vitro gereifte und in vitro fertilisierte Oozyten (Tabellen 10 - 12, CRITSER et al., 1986).

Das Entwicklungsstadium nach in vivo Kultur kann als Kriterium für die Qualität der übertragenen Embryonen herangezogen werden. Bei der in vitro Reifung von Oozyten ermöglicht die in vivo Kultur nach Fertilisation eine Aussage über die Qualität der Oozytenreifung, da nur ein korrekter Ablauf der komplexen Reifungsvorgänge eine physiologische Fertilisation und nachfolgend eine Weiterentwicklung ermöglicht.

Bei den vorliegenden Versuchen konnte durch die Cokultur mit Granulosazellen eine deutliche Verbesserung der Reifung erzielt werden, was durch die höhere Teilungsrate und das Stadium der Entwicklung zum Ausdruck kam.

Schaf und Kaninchen sind für die Kultur von Rinderembryonen gleichermaßen geeignet. Das Kaninchen ist hierbei dem Schaf vorzuziehen, da der Aufwand sowohl für die Haltung als auch für die Übertragung und Wiedergewinnung der Embryonen erheblich geringer ist. Hinzu kommt, daß die Darstellung von Uterus und Eileiter beim Schaf häufig durch die starke Füllung der Vormägen erschwert wird. Eine Entleerung dieser durch Futterentzug ist auf Grund der Zeitdauer, die hierfür nötig wäre, aus tierschützerischen Gründen abzulehnen.

Entgegen früherer Meinung fanden LAMBERT et al. (1986) heraus, daß eine Kultur von Rinderembryonen im Kanincheneileiter bis zu 120 h erfolgreich ist, so daß durch diese Methode selbst Morula- und Blastozystenstadien erreicht werden können. In den vorliegenden Untersuchungen entspricht die Entwicklung bis zu 8-Zellern jedoch nicht dem ca. 88 h post fertilisationem zu erwartenden Stadium früher Morulae. Die Entwicklung wurde also bei allen Oozyten frühzeitig angehalten.

Eine endgültige Beurteilung der Oozytenreifung kann erst zu einem verhältnismäßig späten Zeitpunkt der Entwicklung durchgeführt werden, da sich eine unvollständige Reifung zu den verschiedensten Zeitpunkten während Fertilisation und früher Embryonalentwicklung auswirken kann (STAIGMILLER und MOOR, 1984). Erst die Entwicklung bis zur Blastozyste ist daher ein verlässliches Kriterium für eine vollständige Oozytenreifung.

Der Grund für die mangelhafte Reifung in diesen Experimenten ist vermutlich in der Kultur in einem statischen System zu suchen.

Es gibt erste Hinweise, daß die Oozytenreifung in Cokultur mit Granulosazellen in einem nichtstatischen System auch beim Rind adäquate Bedingungen für eine vollständige Reifung bietet (CRITSER et al., 1986). Die Kultur von Granulosazellen im nichtstatischen System verhindert eine vorzeitige Luteinisierung der Zellen (STAIGMILLER und MOOR, 1984).

Hormonanalysen ergaben, daß die Granulosazellen sich nach 24stündiger statischer Kultur im Stadium der beginnenden Luteinisierung befanden (vgl. 4.3.5). Die Konzentrationen von Progesteron und 17- β -Östradiol lagen hierbei etwa um den Faktor 100 niedriger als die von KRUIP und DIELEMANN (1982) ermittelten physiologischen Werte der Follikelflüssigkeit. Diese niedrigen Steroidkonzentrationen und die vorzeitige Luteinisierung der Granulosazellen könnten die entscheidenden Mängel der hier angewandten Reifungsbedingungen sein.

Für die Reifung von Schafoozyten sind erhebliche Steroidkonzentrationen nötig. Oozyten, die ohne eine ausreichende Steroidkonzentration gereift wurden, wiesen eine anormale Fertilisation und eine vorzögerte Teilung auf. Keine dieser Oozyten konnte sich bis zur Blastozyste entwickeln (MOOR, 1978).

Die Veränderungen der Steroidhormonkonzentration während der Follikelreifung weisen eine spezifische Dynamik auf (KRUIP et al., 1983). THIBAUT (1977) schreibt die entscheidende Rolle des Follikels bei der Oozytenreifung der klassischen Sequenz der Steroidaktivität nach der LH-Ausschüttung zu.

Es sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden, bei denen versucht werden sollte, diese Dynamik der Steroidhormone durch Medienwechsel und Hormonzugaben in physiologischer Konzentration nachzuvollziehen.

In den Experimenten der ersten Versuchsperiode war eine Aussage über Reifung und Fertilisation auch nach in vivo Kultur nur bedingt möglich. Die Teilungsraten der in NEWCOMB's Medium gereiften Oozyten unterschieden sich nicht von der Anzahl parthenogenetisch aktivierter Oozyten. Dies gilt auch für Oozyten der II. Versuchsperiode, die in TL-Medium gereift und anschließend in vivo kultiviert wurden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß für eine sichere Beurteilung von Fertilisation

sation und Weiterentwicklung die stichprobenartige Erfassung der Fertilisationsrate durch Fixierung und Färbung bzw. die Inkubation von Kontrolloozyten unerlässlich ist. Dies wird durch XU et al. (1986) bestätigt. In ihren Untersuchungen fanden sie, daß ein verhältnismäßig hoher Anteil an Rinderoozyten nach Kultur in Kanincheneileitern parthenogenetisch aktiviert war.

Parthenogenese kann bei Säugetieren durch eine Reihe von physikalischen und chemischen Stimuli ausgelöst werden (WHITTINGHAM, 1980). Zu den physikalischen Auslösern zählt auch eine mechanische Manipulation der Oozyten. Diese könnte eine der Ursachen parthenogenetischer Teilung in vitro gereifter Rinderoozyten sein.

Unter den chemischen Substanzen, die Oozyten aktivieren können, sind unter anderen Narkotika aufgelistet (ebenda). Denkbar wäre, daß unvollständig gereifte Oozyten auf solche Einflüsse besonders empfindlich reagieren.

Der überwiegende Teil der Untersuchungen über Parthenogenese wurde bei Maus und Kaninchen durchgeführt. Bei diesen Spezies ist eine parthenogenetische Entwicklung bis zum Blastozystenstadium möglich (WHITTINGHAM, 1980). Beim Rind dagegen endet die parthenogenetische Entwicklung bereits nach wenigen Teilungsschritten (TROUNSON et al., 1977). Hier scheint die Entwicklung bis zum Blastozystenstadium ein verlässliches Kriterium für eine normale Entwicklung nach einer Fertilisation zu sein.

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Oozytenreifung in Cokultur mit Granulosazellen einen entscheidenden Fortschritt für die in vitro Kultur von Rinderoozyten erbracht hat. Sicherlich wird es in absehbarer Zukunft möglich sein, eine große Anzahl von Oozyten vollständig in vitro zu reifen, um dadurch nach in vitro Fertilisation eine normale Embryonalentwicklung zu ermöglichen. Diese neue Biotechnik birgt für einige Bereiche der Praxis, hauptsächlich aber für eine Vielzahl von Forschungsbereichen in Reproduktionsphysiologie und Tierzucht zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten.

6.4 Anwendungsmöglichkeiten

In der Literatur gibt es bei den Haussäugetieren sowohl für das Schaf als auch für das Rind erste Berichte, daß die vollständige Reifung weiblicher Keimzellen in vitro möglich ist (STAIGMILLER und MOOR, 1984;

CRITSER et al., 1986; CHENG et al., 1986). Die Anwendung dieser Methode wäre auf Grund der natürlicherweise sehr eingeschränkten Zahl an Nachkommen weiblicher Tiere vor allem bei diesen beiden Spezies aus tierzüchterischer Sicht besonders interessant. Auch in den vorliegenden Experimenten ist es gelungen, die Reifung von Rindereizellen durch Kokultur mit Follikelzellen zu verbessern.

Ein entscheidender Vorteil der *in vitro* Reifung von Rinderoozyten ist die Möglichkeit, kostengünstig Zygoten und Embryonen zu produzieren. Dieser Vorteil kommt bei allen Anwendungsbereichen gleichermaßen zum Tragen, wird jedoch in Bereichen der praktischen Nutzenanwendung eher als Entscheidungskriterium für die Anwendbarkeit neuer Biotechniken herangezogen. BREM (1986) schätzt die Kosten pro gewonnenen Embryo bei konventioneller unblutiger Spülung ohne Kosten für Haltung und Fütterung von Spender- und Empfängertieren auf DM 121,-. Hierbei wird eine Gewinnung von 6 Embryonen pro Spendertier zugrunde gelegt.

Durch die *in vitro* Reifung von Oozyten sollte eine erhebliche KOSTEN-MINDERUNG möglich sein. Bei der Verwendung von Schlachtovarien entfallen die Kosten für die Haltung von Spendertieren ganz, was sich vor allem in der Besamungszucht auswirken würde, da die Anmietung dieser Tiere hier einen zusätzlichen Kostenfaktor darstellt (BREM, 1979). Da pro Tag Oozyten von zahlreichen Tieren gleichzeitig gewonnen und gereift werden können, senkt dies den Arbeits- und Kostenaufwand pro Tier. Der Aufwand für die *in vitro* Reifung und *in vitro* Fertilisation liegt außerdem weit unter dem für Synchronisation, Superovulation, Besamung und Spülung der Spendertiere bei herkömmlicher Gewinnung der Embryonen.

Die in den vorliegenden Untersuchungen ermittelten Zahlen bezüglich der Oozytengewinnung unterscheiden sich nicht von denen, die der Kostenschätzung von BREM (1986) zugrunde liegen (6 brauchbare Oozyten pro Tier; 37 % Ausfallrate am Schlachthof). Im Gegensatz zum konventionellen Embryotransfer stellen hier jedoch die Spendertiere bei Verwendung von Schlachtovarien keinen limitierenden Faktor dar. Bei der gezielten Applikation dieser Methode zur Produktion von Nachkommen herausragender Spendertiere bieten sich zwei Möglichkeiten der Oozytengewinnung an:

- Entnahme der Ovarien nach Schlachtung oder Tod des Tieres
- Chirurgische Follikelpunktion am lebenden Tier.

Für beide Möglichkeiten lägen die hier ermittelten Gewinnungsraten bei der Follikelpunktion zu niedrig. In diesem Fall wäre ein entsprechender Mehraufwand zur Steigerung der Ausbeute bei der Oozytengewinnung durchaus gerechtfertigt.

An Schlachtovarien wäre neben der Punktion der oberflächlich sichtbaren Follikel durch Zerkleinerung des Ovars die Gewinnung der Oozyten aus tieferliegenden Follikeln möglich. Die bereits erwähnte zusätzliche Spülung der Follikel bietet sich sowohl bei Schlachtovarien als auch bei der Punktion am lebenden Tier an.

Die Follikelpunktion durch Laparaskopie erfordert einige Erfahrung. Ein erfahrener Operateur erreicht jedoch Gewinnungsraten bis zu 79 % (LAMBERT et al., 1986). Die Punktion kleiner Follikel dürfte im Vergleich zu superovulierten Tieren eine Erschwernis darstellen. Der große Vorteil hierbei liegt jedoch darin, daß eine Gewinnung unabhängig von einer Reaktion auf Hormongaben erfolgen kann. Die Superovulation stellt in konventionellen Embryo-Transfer-Programmen nach wie vor das größte Problem dar (SEIDEL, 1984).

Durch niedrig dosierte stimulierende Gonadotropingaben läßt sich die Zahl kleiner Tertiärfollikel auf dem Ovar zuverlässig erhöhen (STAIG-MILLER und MOOR, 1984). Dadurch wäre eine weitere Steigerung der Oozytenausbeute zu erreichen. Darüberhinaus ließe sich die Follikelpunktion am lebenden Tier unabhängig vom Zyklusstand mehrmals wiederholen. Auch Tiere, die zur großzystischer Degeneration der Ovarien neigen, kommen nach der Behandlung dieser als potentielle Spendertiere in Betracht. Nur wenige Veränderungen wie z.B. völlige Atresie der Gonaden, ovarielle Tumoren oder umfangreiche Verwachsungen schließen die Gewinnung unreifer Oozyten völlig aus.

Durch die in vitro Reifung von Oozyten wird eine bessere Nutzung des WEIBLICHEN FORTPFLANZUNGSPOTENTIALS möglich. In der Tierzucht ist dies vor allem für die Steigerung der Nachkommenzahl weiblicher Spitzentiere von Bedeutung. Konventioneller Embryotransfer kann jedoch nur kostendeckend und gewinnbringend eingesetzt werden, wenn der Verkauf der produzierten hochwertigen Zuchttiere zu überdurchschnittlichen Preisen möglich ist (BREM, 1986). Dies trifft vor allem für die USA zu, wo sich ein regelrechter Industriezweig etablieren konnte (SEIDEL, 1984). In der BRD wird der Embryotransfer in wesentlich geringerem Umfang eingesetzt und beschränkt sich auf milchbetonte Rassen.

Durch die Kostensenkung durch in vitro Produktion von Embryonen könnte ein weitreichender Einsatz des Embryotransfers auch bei Zweinutzungsrassen und vor allem bei Fleischrassen wirtschaftliche Bedeutung erlangen.

Dadurch könnten zahlreiche Vorteile, die die Biotechnik 'Embryotransfer' bietet besser zum Tragen kommen. Durch Verkürzung des Generationsintervalls wäre zusammen mit einer Steigerung der Zahl der Nachkommen weiblicher Spendertiere eine schnellere Reaktion auf die Marktentwicklung möglich. Auf europäischer Ebene sind derzeit noch keine konkreten Ansatzpunkte zu erkennen, das Zuchtziel als Konsequenz auf die Milchquotenregelung zu ändern. Da mit den bisherigen Zuchtzielen nach wie vor die höchsten Einnahmen erzielt werden, ist die Bereitschaft einer Anpassung an Veränderungen der Marktsituation gering (CEC-Seminar, Brüssel, Juni 1985). Als Ursache hierfür ist die Tatsache zu sehen, daß bedingt durch einen derzeit noch sehr langen Generationsintervall Veränderungen in der Rinderzucht nicht mit Änderungen des Marktes Schritt halten können. Die Möglichkeit, das dadurch entstandene starre Gefüge zu durchbrechen, läßt den Einsatz neuer Biotechniken als lohnenswert erscheinen.

Von Bedeutung ist auch die Verbesserung der ZUCHTWERTSCHÄTZUNG bei weiblichen Tieren. Ausschlaggebend hierfür ist die Möglichkeit, durch getrennte in vitro Fertilisation mit Sperma unterschiedlicher Bullen eine wesentlich höhere Anzahl mütterlicher Halbgeschwister zu erzeugen. Eine Züchtung auf Leistungssicherheit, Belastbarkeit und Nutzungsdauer, wie sie von KRÄUBLICH und GRAF (1984) vorgeschlagen wurde, wäre dadurch besser zu verwirklichen.

Für die ERBFEHLERDIAGNOSTIK bietet die Methode der in vitro Reifung die Möglichkeit auch Anlage- oder Merkmalsträger zu verwenden, bei denen eine herkömmliche Gewinnung von Embryonen nicht möglich ist. Die größere Zahl der potentiell verfügbaren Oozyten und die geringeren anfallenden Kosten könnten einen routinemäßigen Einsatz zur Prüfung von Besamungsbullen ermöglichen. Erkrankungen, die durch chromosomale Veränderungen hervorgerufen werden, könnten durch zytogenetische Methoden bereits an frühen Embryonalstadien erkannt werden.

Die Testung weiblicher Tiere wird jedoch in absehbarer Zukunft keine große Bedeutung erlangen. Die Verbreitung von Nachkommen weiblicher Spendertiere ist trotz Anwendung neuer Techniken gering im Vergleich zu der männlicher Tiere, die in der künstlichen Besamung eingesetzt werden.

Für die Anlage von GENRESERVEN bringt die Gewinnung und Reifung von Oozyten aus kleinen Tertiärfollikeln einen entscheidenden Fortschritt, um das Fortpflanzungspotential meist sehr kleiner Tierpopulationen optimal zu nutzen und zu erhalten.

Einen durch die in vitro Reifung von Rinderoozyten möglicher Einsatz der IN VITRO FERTILISATION wird nur in Zusammenhang mit dieser eine größere Bedeutung zukommen. Ein therapeutischer Einsatz beispielsweise bei mangelhafter Spermaqualität wird in der Rinderzucht keine Rolle spielen, da durch den Einsatz der künstlichen Besamung wenige männliche Spitzentiere ausreichen, um den Zuchtfortschritt zu gewährleisten (EVERETT, 1984).

Für einen Einsatz als FERTILITÄTSTEST bei Besamungsbullen wäre der Aufwand durchaus gerechtfertigt. Dem Befruchtungsergebnis kommt eine große wirtschaftliche Bedeutung zu. Durch die frühzeitige Aussage, die ein derartiger Fertilitätstest liefern könnte, wäre eine zusätzliche Selektionsmöglichkeit für den Einsatz von Besamungsbullen gegeben.

Die KRYOKONSERVIERUNG von unbefruchteten Eizellen wurde erstmals für Mäuseoozyten beschrieben (WHITTINGHAM, 1977). Umfangreiche Untersuchungen sollten auch beim Rind durchgeführt werden. Durch die Möglichkeit, Oozyten in vitro zu reifen kann ein Vergleich zwischen Oozyten verschiedener Reifestadien durchgeführt werden.

Mit zunehmender Bedeutung der Anlage von Genreserven wird auch die Bedeutung des Tiefgefrierens von unbefruchteten Eizellen steigen. Möglicherweise ist die unbefruchtete Oozyte weniger empfindlich gegenüber Einflüssen des Tiefgefrierprozesses als Embryonen.

Die Vorteile, die eine in vitro Produktion von Rinderembryonen für die FORSCHUNG bringt, lassen sich im Wesentlichen 5 Punkten zuordnen:

1. Kostenersparnis
2. Geringerer Aufwand - kürzere Planungszeiten
3. Große Anzahl an Embryonen
4. Verfügbarkeit früher Embryonalstadien
5. Untersuchungsmöglichkeiten vor und während der Fertilisation

Hohe Kosten, die bei Arbeiten mit Rinderembryonen entstehen, haben die bisherigen Versuchsprogramme stark belastet und die Arbeitsmöglichkeiten weitestgehend eingeschränkt. Der hohe Aufwand der Gewinnung von Rinderembryonen und die langfristige wenig flexible Planungsanforderung zwang in weiten Bereichen zur Verwendung von Versuchstieren als Modellsystem. Durch die *in vitro* Produktion von Rinderembryonen werden in zahlreichen Bereichen erstmals umfangreiche grundlegende Untersuchungen ermöglicht. Darüberhinaus ist eine Vertiefung bisher gewonnener Erkenntnisse möglich. Die große Anzahl an anfallenden Embryonen ermöglicht umfangreichere vergleichende Untersuchungen, deren Aussage z.B. durch biochemische Analysen oder zahlenmäßig größere Kontrollgruppen abzusichern ist. Verschiedenartige Behandlung von Oozyten, Sperma oder Embryonen ist ohne großen Mehraufwand möglich. Daneben ist eine zeitgleiche Untersuchung oder Verwendung zahlreicher Embryonen unterschiedlicher Abstammung denkbar. Die Kultur im Kanincheneileiter stellt dabei eine vom Aufwand her vertretbare Methode dar, eine große Anzahl von Embryonen zu kultivieren. Die Untersuchungen an *in vitro* Kultursystemen sollten zur Objektivierung der Aussage parallel mit einer Kultur im lebenden System verglichen werden.

Die Verfügbarkeit früher Embryonalstadien stellt für die Forschungsbereiche der Mikromanipulation eine wichtige Voraussetzung dar. Die Verwendung früher Embryonen erhöht z.B. bei der künstlichen Erstellung von Chimären die Erfolgchancen; für den Kerntransfer oder die Kerninjektion fremder DNA ist die Verwendung von Zygoten oder frühen Teilungsstadien eine Grundvoraussetzung.

Bislang war eine Gewinnung von Zygoten oder frühen Embryonen beim Rind nur durch die sehr aufwendige chirurgische Eileiterspülung möglich. Die Methode der *in vitro* Fertilisation *in vivo* gereifter Oozyten wird wegen des großen Aufwands der Oozytengewinnung hier nur eine untergeordnete Bedeutung erlangen.

Der Untersuchung der frühen Embryonalentwicklung kommt neben dem wissenschaftlichen Interesse auch eine sehr große wirtschaftliche Bedeutung zu. 19 - 37 % der Verluste während der Embryonalentwicklung treten in den ersten Tagen post fert. auf (ROCHE et al., 1981; MAURER und CHENAULT, 1983). Untersuchungen an männlichen und weiblichen Gameten vor und während der Fertilisation könnten zahlreiche noch offene Fragen klären. Eine mögliche Steigerung des Befruchtungserfolgs durch ein besseres Verständnis der ablaufenden Prozesse wäre wiederum von wirtschaftlichem Interesse.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Rinderoozyten wurden von Schlachtovarien durch Punktion kleiner Follikel (2 - 5 mm Ø) gewonnen und 24 h bei 39° C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Vorversuche ergaben, daß Reifung, Fertilisation und Kulturergebnisse getrennt beurteilt werden müssen, um eine Aussage zu ermöglichen.

Als Reifungsmedien dienten modifiziertes TL-Medium (10 % FCS, 11 µg/ml Pyruvat, 10 µg/ml FSH) oder TCM 199 mit 1×10^6 Granulosazellen/ml Medium (Zusätze wie oben). Die Kultur der Granulosazellen erfolgte in einem statischen System.

Nach Inkubation in TCM 199 zusammen mit Granulosazellen vollendete im Vergleich zur Inkubation in TL-Medium (73,2 %) ein höherer Anteil an Oozyten die Meiose (80,5 %).

Eine physiologische Oozytenreifung beinhaltet neben der Vollendung der Reifeteilung auch Veränderungen des Zytoplasmas, die erst an einer physiologischen Fertilisation und Embryonalentwicklung erkennbar sind.

Zur Erfassung und Beurteilung der Zytoplasmareifung wurden Versuche unternommen, in vitro gereifte Oozyten in vitro zu fertilisieren und in vitro oder in vivo zu kultivieren.

Für die IVF wurde Tiefgefriersperma verwendet, das durch ein Anreicherungsverfahren (swim-up procedure) aufbereitet wurde. Zur Kontrolle einer möglichen parthenogenetischen Aktivierung wurden parallel zu jedem Versuchsansatz Oozyten zusammen mit abgetötetem Sperma inkubiert.

Durch die Inkubation der Oozyten in Cokultur mit Granulosazellen konnte eine deutliche Verbesserung der Zytoplasmareifung erreicht werden (43,9 % Aktivierung, 76,3 % der aktivierten Oozyten bildeten zwei Vorkerne aus - TL-Medium: 35,2 %/52,1 %).

In vitro gereifte und in vitro fertilisierte Rinderoozyten wiesen nach in vitro Kultur nur sehr geringe Weiterentwicklungsraten bis zum 4-Zell-Stadium auf (9,4 - 18,7 %).

Höhere Teilungsraten wiesen die Oozyten beider Reifungsgruppen nach in vivo Kultur in Schaf- oder Kanincheneileitern auf (29,4 % - 46,8 %). Ein höherer Anteil (11,5 %) der in Granulosa-Cokultur gereiften Oozyten entwickelte sich zu 8-Zellern.

Durch die Inkubation von Rinderoozyten in Cokultur mit Granulosazellen konnte zwar eine deutliche Verbesserung der Reifungsbedingungen erreicht werden, eine vollständige, physiologische Reifung war jedoch unter den beschriebenen Bedingungen nicht möglich.

Als mögliche Gründe hierfür werden unzureichende Steroidhormonkonzentrationen in den Reifungsmedien und eine Hormonimbalance durch vorzeitige Luteinisierung der Granulosazellen diskutiert.

Für die prospektive in vitro Produktion von entwicklungsfähigen Rinderzygoten werden einige Anwendungsmöglichkeiten aufgezeigt. Von besonderem Interesse wäre die kostengünstige Bereitstellung früher Embryonalstadien für Forschungszwecke.

SUMMARY

IN VITRO PRODUCTION OF BOVINE ZYGOTES

Bovine ovaries were collected at a local slaughterhouse. Oocytes were obtained by puncturing small follicles (2 - 5 mm in diameter) and incubated for 24 h at 39° C, 5 % CO₂ and 100 % relative humidity. Preliminary studies showed, that the evaluation of oocytematuration, fertilization and futher development has to be done seperately.

Maturation media consisted of either modified TL-Medium (10 % FCS, 11 µg/ml pyruvate, 10 µg/ml FSH) or of TCM 199 together with granulosa cells (1 x 10⁶ cells/ml, supplemented as above). The culture of the granulosa cells was performed in a static system. Oocytes matured in TCM 199 with granulosa cells resumed meiosis at a higher percentage (80.5 % metaphase II) compared to those incubated in TL-Medium (73,2 % metaphase II).

The physiological maturation of oocytes requires both structural changes of the nucleus as well as changes in the cytoplasm and is expressed in normal fertilization and developmental competence.

Experiments were carried out, trying to fertilize in vitro matured oocytes and to determine their further development during in vivo or in vitro culture.

In vitro fertilization was performed with frozen-thawed bovine semen, which was prepared for fertilization by a swim-up-procedure. For each replicate some oocytes were cultured with killed spermatozoa to serve as a control against possible parthenogenetic activation of oocytes during in vitro or in vivo culture. The frequency of activation after coincubation with a sperm suspension (for 24 h) was higher in oocytes matured in coculture with granulosa cells in TCM 199 (43.9 % versus 35.3 %). A highly significant difference was observed in the frequency of both male and female pronuclei in this culture system compared to TL-Medium (76.3 % versus 52.1 %).

After a further culture in vitro (72 h) only 9.4 % (oocytes matured in TL-Medium) and 16.8 % (oocytes matured in coculture with granulosa cells) showed further development. Cleavage was arrested at the 4 cell stage. However after in vivo culture (72 h) in higher percentage of oocytes showed cleavage (29.4 %/46.8 %). A higher number of oocytes that had been matured in the granulosa coculture system reached the 8 cell stage (11.5 %).

The incubation of bovine oocytes in coculture with granulosa cells provided improved maturation conditions, however full developmental competence could not be achieved by the system applied in these experiments (impaired development to the 8 cell stage). Hormonal imbalances in the maturation media and luteinization of the granulosa cells are discussed as possible reasons for the inadequacy of culture conditions.

Some possibilities of application for the prospective in vitro production of developmentally competent bovine zygotes are discussed. The provision of a large number of early embryos for research purpose would be of special interest.

8. SCHLÜßGEDANKEN

Die Zeit, die zwischen der Erarbeitung neuer Techniken und deren praktischer Nutzenanwendung verstreicht, wird immer kürzer.

Vergingen beispielsweise zwischen dem ersten erfolgreichen Embryotransfer beim Rind (WILLET et al., 1951) und dessen weitverbreiteten Einsatz in der Tierproduktion Mitte der siebziger Jahre noch mehr als zwei Jahrzehnte, so lagen nur noch wenige Jahre zwischen dem ersten Bericht über eine erfolgreiche mikrochirurgische Erstellung von Rinderzwillingen (WILLADSEN et al., 1981) und deren kommerzieller Nutzenanwendung. Folglich verbleibt immer weniger Zeit, Gefahren und Risiken eines weitverbreiteten Einsatzes neuer Biotechniken abzuschätzen und mögliche Konsequenzen zu erkennen.

Erst in jüngster Zeit ist neben der zunehmenden Technisierung unserer Umwelt auch die biologische Forschung ins Bewußtsein der Öffentlichkeit gelangt und Gegenstand zahlreicher Diskussionen.

Leider stiftet hierbei die verallgemeinernde Verwendung des Begriffes Gentechnologie Verwirrung. Eine deutliche Differenzierung zwischen Gentechnologie und Reproduktionsbiologie findet nicht statt. Enge Verknüpfungen dieser beiden Bereiche sind allerdings gegeben, da die neuen Reproduktionstechniken häufig erst die Voraussetzung für eine gezielte Anwendung der Gentechnologie bei Säugerspezies schaffen.

Divergierende Meinungen über die Abschätzbarkeit der Folgen neuer Biotechniken emotionalisieren die Diskussion. Unsicherheit darf keineswegs zu der Forderung führen, die Forschung im Bereich der Reproduktionsbiologie zu behindern. Jedoch müssen ethische Zweifel und Angst Gehör finden. Die Brisanz der Materie erfordert eine dauerhafte und lebendige Diskussion, schon allein um denjenigen, der damit arbeitet, zu einer fortwährenden Reflexion zu zwingen.

Teilt man auch Goethe's^{*} Meinung nicht: "... sie (die Natur) hat immer recht, und die Fehler und Irrtümer sind immer des Menschen," so sollte man ihm doch folgen, wenn er sagt:

"Die Natur versteht gar keinen Spaß, sie ist immer wahr, immer ernst, immer strenge."

In Anlehnung daran fordert FIKENTSCHER (1983) die Wissenschaftler der Gegenwart auf, "... bestrebt zu sein, alle aus neugewonnenem Wissen sich herleitenden Anwendungsmöglichkeiten daraufhin zu prüfen, ob sie sich in einem evolutionären Rahmen halten lassen, oder einer revolutionären Katastrophe Vorschub leisten können."

Unterschiedliche Rechtsverständnisse und ethische Normen lassen die Schaffung von weltweit gültigen Rechtsgrundlagen unmöglich erscheinen. So kann nur der einzelne Wissenschaftler, der sich seiner Verantwortung bewußt ist und aus dieser Verantwortung heraus den gesamten möglichen Anwendungsbereich seiner Forschungsergebnisse einer kritischen Würdigung unterzieht, ein rechtlich und ethisch vertretbares Ziel erreichen.

"Wir sind nicht nur für die Konsequenzen unseres unmittelbaren Tuns verantwortlich, sondern sollten uns auch mitverantwortlich fühlen für die Richtung der gesamten wissenschaftlichen Entwicklung Es gibt keinerlei Verantwortung mehr, wenn der einzelne sich davon freispricht. Wer soll Verantwortung übernehmen, wenn es nicht einzelne Menschen tun? (BERCHEM, 1986)

★

ECKERMANN: Gespräche mit Goethe in den letzten Jahren seines Lebens,
Freitag, 13.2.1829

9. LITERATURVERZEICHNIS

AI-HASANI, S., A. TOLKSDORF, H. van der VEN, K. DIEDRICH, D. KREBS
1986

Erfolgreiche in-vitro-Befruchtung von eingefrorenen - aufgetauten
Kaninchenoozyten

Zuchthygiene 21, 151-152

BAE, I.-H., R.H. FOOTE, 1975 a

Utilization of glutamine for energy and protein synthesis by cultured
rabbit follicular oocytes

Exp. Cell Res. 90, 432-436

BAE, I.-H., R.H. FOOTE, 1975 b

Effects of hormones on the maturation of rabbit oocytes recovered from
follicles of various sizes

J. Reprod. Fert. 42, 357-360

BAE, I.-H., R.H. FOOTE, 1975 c

Carbohydrate and amino acid requirements and ammonia production of
rabbit follicular oocytes matured in vitro

Exp. Cell Res. 91, 113-118

BAE, I.-H., R.H. FOOTE, 1980

Maturation of rabbit follicular oocytes in a defined medium of varied
osmolarity

J. Reprod. Fert. 59, 11-13

BALL, G.D., M.L. LEIBFRIED, R.W. LENZ, R.L. AX, B.D. BAVISTER, N.L.
FIRST, 1983

Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular
oocytes

Biol. Reprod. 28, 717-725

BALL, G.D., M.L. LEIBFRIED, R.L. AX, N.L. FIRST, 1984

Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro

J. Dairy Sci. 67, 2775-2785

BAVISTER, B.D., R. YANAGIMACHI, 1977

The effects of sperm extracts and energy sources on the motility
and acrosome reaction of hamster spermatozoa in vitro

Biol. Reprod. 16, 228-237

BERCHEM, Th., 1986

Zur Verantwortung des Akademikers in unserer Zeit

Unitas 7, 73-77

BETTERIDGE, K.J., 1984

The folklore of sexing

Theriogenology 21, 3-6

BIGGERS, J.D., D.G. WHITTINGHAM, R.P. DONAHUE, 1967

The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote

Proc. Natl. Acad. Sci. 58, 560-567

BRACKETT, B.G., 1983

A review of bovine fertilization in vitro

Theriogenology 19, 1-15

BRACKETT, B.G., G. OLIPHANT, 1975

Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro

Biol. Reprod. 12, 260-274

BRACKETT, B.G., Y.K. OH, J.F. EVANS, W.J. DONAWICK, 1978

In vitro fertilization of cow ova

Theriogenology, 9, 89

BRACKETT, B.G., Y.K. OH, J.F. EVANS, W.J. DONAWICK, 1980

Fertilization and early development of cow ova

Biol. Reprod. 23, 169-205

BRACKETT, B.G., D. BOUSQUET, M.L. BOYCE, W.J. DONAWICK, J.F. EVANS,

M.A. DRESSEL, 1982 a

Normal development following in vitro fertilisation in the cow

Biol. Reprod. 27, 147-158

BRACKETT, B.G., D. BOUSQUET, M.A. DRESSEL, 1982 b

In vitro sperm capacitation and in vitro fertilization with normal development in the rabbit

J. Androl. 3, 402-411

BRACKETT, B.G., C.L. KEEFER, C.G. TROOP, W.J. DONAWICK, K.A. BENNETT,
1984

Bovine twins resulting from in vitro fertilization
Theriogenology 21, 224

BREGULLA, K., U. GERLACH, R. HAHN, 1974

Versuche zur extrakorporalen Reifung, Befruchtung und Embryonenzucht
mit Rinderkeimzellen
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 81, 445-476

BREM, G., 1979

Kostenanalyse über Verfahren und Einsatzmöglichkeiten von
Embryotransfer
München: Diss. med. vet.

BREM, G., 1986

Mikromanipulation an Rinderembryonen und deren Anwendungsmöglichkeiten
in der Tierzucht
Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag

BREM, G., H. TENHUMBERG, H. KRÄUBLICH, 1984

Chimerism in cattle through microsurgical aggregation of morulae
Theriogenology, 22, 609-613

BRINSTER, R.L., 1968

In vitro culture of mammalian embryos
J. Anim. Sci., 27, 1-14

BROCK, H., L.E. ROWSON, 1952

The production of viable bovine ova
J. agric. Sci. 42, 479

BYSKOV, A.G., 1978

Follicular Atresia
In: The Vertebrate Ovary, ed. R.E. Jones, New York: Plenum Press
533-562

CAMOUS, S., Y. HEYMAN, Y. MENEZO, 1984

In vitro culture of early bovine embryos with trophoblastic vesicles:
Cleavage through the block stage, followed by pregnancy after transfer
Theriogenology 21, 226

CHANG, M.C., 1955

The maturation of rabbit oocytes in culture and their maturation
activation, fertilization and subsequent development in the
fallopian tubes

J. exp. Zool. 128, 379-405

CHANG, M.C., 1959

Fertilization of rabbit ova in vitro
Nature, 184, 466-467

CHANNING, C.P. 1979

Intraovarian inhibitors of follicular fluid

In: Ovarian Follicular Development and Function ed. A.R. Midgley
and W.A. Sadler, New York: Raven Press, 59-64

CHAVAZ, I., H. KONIG, C. GAILLARD, F. HUNZIKER, M. SCHNEEBERGER,
A. TONTIS, 1986

Testing swiss braunvieh bulls for the inherited syndrome of
arachnomelia and arthrogryposis (SAA) by examining their offspring
at the fetal stage

Proc. 3rd World Congr. Gen. Appl. Livest. Prod. Lincoln, Nebraska
16.-22. Juli, 1986

CHENG, W., C. POLGE, 1983

In vitro fertilization of pig oocytes

Society for the Study of Fertility, Winter Meeting, Programme &
Abstractes of Papers

CHENG, W.T.K., R.M. MOOR, C. POLGE, 1986

In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo
and in vitro

Theriogenology, 25, 146

CHURCH, R.B., B. SHEA, R. TERVIT, 1974

Chromosomal analysis of bovine follicular oocytes after incubation
in vitro

J. Anim. Sci. 39, 142

CLARK, J.R., D.J. DIERSCHKE, R.C. WOLF, 1979

Estrogen-induced follicular atresia in rhesus monkeys

In: Ovarian Follicular Development and Function, ed. A.R. Midgley
W.A. Sadler, New York: Raven Press, 71-74

CONDON, W.A., V.K. GAUJAM, R.M. KENNEY, C.P. CHANNING, 1979

Follicular atresia in the mare

In: Ovarian Follicular Development and Function, ed. A.R. Midgley and
W.A. Sadler, New York: Raven Press, 75-78

CRAN, D.G., R.M. MOOR, 1980

The development of oocytes and ovarian follicles of mammals

Sci. Prog. 66, 371-383

CRITSER, E.S., G.D. BALL, J.J. O'BRIEN, N.L. FIRST, 1983

Use of fluorescent stain for visualization of nuclear material in
living gametes and early embryos

Biol. Reprod. 28, 140

CRITSER, E.S., M.L. LEIBFRIED, N.L. FIRST, 1984

The effect of semen extension, cAMP and caffeine on in vitro fertili-
zation of bovine oocytes

Theriogenology 21, 625-631

CRITSER, E.S., M.L. LEIBFRIED-RUTLEDGE; W.H. EYESTONE, D.L. NORTHEY,
N.L. FIRST, 1986

Acquisition of developmental competence during maturation in vitro

Theriogenology, 25, 150

CROSBY, J.M., J.C. OSBORN, R.M. MOOR, 1981

Follicle cell regulation of protein synthesis and developmental compe-
tence in sheep oocytes

J. Reprod. Fert. 62, 575-582

CROSS, P.C., R.L. BRINSTER, 1970

In vitro development of mouse oocytes

Biol. Reprod. 3, 298-307

CROSS, P.C., R.L. BRINSTER, 1974

Leucine uptake and incorporation at three stages of mouse oocyte maturation

Exp. Cell Res. 86, 43-46

DEKEL, N., W.H. BEERS, 1980

Development of the rat oocyte in vitro: Inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus

Developm. Biol. 75, 247-254

DE LALLA, O.F., J.W. GOFMAN, 1954

Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins

Meth. Bioch. Anal. 1, 459-478

DIELEMANN, S.J., Th.A.M. KRUIP; P. FONTIJNE, W.H.R. de JONG,

G.C. van der WEYDEN, 1983

Changes in oestradiol, progesterone and testosterone concentrations in follicular fluid and in the micromorphology of preovulatory bovine follicles relative to the peak of luteinizing hormone

J. Endocrin. 97, 31-42

DONAHUE, R.P., S. STERN, 1968

Follicular cell support of oocyte maturation. Production of pyruvate in vitro

J. Reprod. Fert. 17, 395-398

EDWARDS, R.G., 1962

Meiosis in ovarian oocytes of adult mammals

Nature 196, 446-450

EDWARDS, R.G., 1965

Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes

Nature 208, 349-351

ELSDEN, R.P., J.F. HASLER, G.E. SEIDEL Jr., 1976

Nonsurgical recovery of bovine eggs

Theriogenology 6, 523-532

ELSDEN, R.P., L.D. NELSON, G.E. SEIDEL Jr., 1979

Embryo transfer in fertile and infertile cows

Theriogenology 11, 17-23

EPEL, D., 1983

Germ cells and fertilization

In: Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, 769-801

EPPIG, J.J., S.L. KOIDE, 1978

Effects of progesterone and oestradiol-17 β on the spontaneous meiotic maturation of mouse oocytes

J. Reprod. Fert. 53, 99-101

EVERETT, R.W., 1984

Impact of genetic manipulation

J. Dairy Sci. 67, 2812-2818

EYESTONE, W.H., N.L. FIRST, 1986

A study of the 8- to 16-cell developmental block in bovine embryos cultured in vitro

Theriogenology 25, 152

FEHILLY, C.B., S.M. WILLADSEN, E.M. TUCKER, 1984

Experimental chimaerism in sheep

J. Reprod. Fert. 70, 347-351

FIKENTSCHER, R., 1983

Grußworte zum 25jährigen Jubiläum der deutschen Gesellschaft zum Studium der Fertilität und Sterilität

Rothenburg ob der Tauber, 29.9.-2.10.1983

FOOTE, W.D., C. THIBAUT, 1969

Investigations on in vitro maturation of cow and pig oocytes

Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys. 9, 329

FUKUI, Y., Y. Sakuma, 1980

Maturation of bovine oocytes cultured in vitro: Relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells

Biol. Reprod. 22, 669-673

FUKUI, Y., M. FUKUSHIMA, H. ONO, 1983

Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation in vitro

J. exp. Zool. 226, 137-142

FULKA, J., J. MOTLIK, 1980

In vitro maturation

Proc. 9th Int. Cong. Anim. Reprod. A.J., Madrid, Vol. II, 55-62

FULKA, J.Jr., A. PAVLOK, J. FULKA, 1982

In vitro fertilization of zona-free bovine oocytes matured in culture

J. Reprod. Fert. 64, 495-499

GILULA, N.B., M.L. EPSTEIN, W.H. BEERS, 1978

Cell-to-cell communication and ovulation

J. Cell Biol. 78, 58-75

GOLBUS, M.S., M.P. STEIN, 1976

Qualitative patterns of protein synthesis in the mouse oocyte

J. Exp. Zool. 198, 337-342

GONDOS, B., 1978

Oogonia and oocytes in mammals

In: The Vertebrate Ovary ed. R.E. Jones, New York: Plenum Press

83-120

GOULD, K.G., C.E. GRAHAM, 1976

Maturation in vitro of oocytes recovered from prepubertal rhesus monkeys

J. Reprod. Fert. 46, 269-270

GWATKIN, R.B.L., O.F. ANDERSEN, 1976

Hamster oocyte maturation in vitro inhibition by follicular fluid components.

Life Sci. 19, 527

HADRI, A.A., J.M. MILLER, R.B.L. GWATKIN, 1971

Culture of mouse oocytes in vitro, using a system without oil or protein

J. Reprod. Fert. 26, 409-411

HAMMOND, J.Jr., 1949

Recovery and culture of tubal mouse ova
Nature 163, 28

HARE, W.C.D., K.J. BETTERIDGE, 1978

Relationship of embryo sexing to the methods of prenatal sex
determination in farm animals: A review
Theriogenology 9, 27-43

HAY, M.F., D.G. CRAN, R.M. MOOR, 1976

Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles
Cell Tiss. Res. 169, 515-519

HEAP, R.B., D.V. ILLINGWORTH, 1977

The mechanism of action of estrogens and progesterone
In: The Ovary, ed. Zuckermann, L., B.J. Weir, 59-150

HENSLEIGH, H.C., A.G. HUNTER, 1983

Influence of FSH and HCG upon the in vitro maturation of bovine oocytes
Theriogenology 19, 133

HENSLEIGH, H.C., A.G. HUNTER, 1985

In vitro maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and
their subsequent in vitro fertilization and cleavage
J. Dairy Sci. 68, 1456-1462

HILLENSJÖ, T., L. HAMBERGER, K. AHREN, 1975

Respiratory activity of oocytes isolated from ovarian follicles
of the rat
Acta endocr. 78, 751-759

HILLENSJÖ, T., C. EKHOLM, K. AHREN, 1978

Role of cyclic AMP in oocyte maturation and glycolysis in the
pre-ovulatory rat follicle
Acta endocr. 87, 377-388

HILLENSJÖ, T., S.H. POMERANTZ, A. SCHWARTZ-KRIPNER, L.D. ANDERSON,
C.P. CHANNING, 1980

Inhibition of cumulus cell progesterone secretion by low molecular
weight fractions of porcine follicular fluid which also inhibit
oocyte maturation
Endocrinology 106, 584-591

HOPPE P.C., K. ILLMENSEE, 1977

Microsurgically produced homozygous-diploid uniparental mice
Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5657-5661

HUNTER, R.H.F., R.A.S. LAWSON, L.E.A. ROWSON, 1972

Maturation, transplantation and fertilization of ovarian oocytes in
cattle
J. Reprod. Fert. 30, 325-328

HUNZICKER-DUNN, M., R.A. JUNGMAHN; L. BIRNBAUMER, 1979

Hormone action in ovarian follicles: Adenyl cyclase and protein
kinase enzyme systems

In: Ovarian Follicular Development and Function ed. A.R. Midgley,
W.A. Sadler, New York: Raven Press, 267-304

IRELAND, J.J., R.L. MURPHEE, P.B. COULSON, 1980

Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross
appearance of the corpus luteum
J. Dairy Sci. 63, 155-160

IRITANI, A., K. NIWA, 1977

Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle
follicular oocytes matured in culture
J. Reprod. Fert. 50, 119-121

IRITANI, A., M. KASAI, K. NIWA, H.B. SONG, 1984

Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated
spermatozoa capacitated in a chemically defined medium
J. Reprod. Fert. 70, 487-492

IWAMATSU, T., M.C. CHANG, 1972

Sperm penetration in vitro of mouse oocytes at various times during
maturation
J. Reprod. Fert. 31, 237-247

JAGIELLO, G.M., W.A. MILLER, M.B. DUCAYEN, J.S. LIN, 1974

Chiasma frequency and disjunctional behaviour of ewe and cow oocytes
matured in vitro
Biol. Reprod. 10, 354-363

- JAGIELLO, G., M.B. DUCAYEN, W.D. DOONAN, 1981
A note on the inhibition of in vitro meiotic maturation of mammalian oocytes by dibutyryl cyclic AMP
J. exp. Zool. 218, 309-311
- JESCH, J., W.D. FOOTE, D.A. PHELPS, F.D. TIBBITTS, 1975
Maturation of bovine oocytes in rabbit oviducts
J. Anim. Sci. 41, 360
- KANAGAWA, H., 1979
Some aspects of bovine ova culture in vitro
Jap. J. vet. Res. 27, 49-54
- KAPLAN, R., N. DEKEL, P.F. KRAICER, 1978
Acceleration of onset of oocyte maturation in vitro by luteinizing hormone
Gamete Res. 1, 59-63
- KING, W.A., D. BOUSQUET, T. GREVE, K.J. BETTERIDGE, 1985
The pronuclei of bovine ova fertilized in vitro
Hereditas 102, 293-296
- KRÄUBLICH, H., 1985
Neue Techniken in der Tierzucht und ihre Anwendungsmöglichkeiten
Züchtungskunde 57, 381-393
- KRÄUBLICH, H., F. GRAF, 1984
Möglichkeiten einer Züchtung auf Leistungssicherheit und Belastbarkeit
Züchtungskunde 56, 431-439
- KRUIP, Th.A.M., B.T.M. VERNOOY, 1981
Influence of temperature on the resumption of meiosis of bovine oocytes in vitro
Proc. IVth Reinier de Graaf Symp., Nijmegen
- KRUIP, Th.A.M., DIELEMAN, S.J., 1982
Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures
Reprod. Nutr. Develop. 22, 465-473

KRUIP, Th.A.M., D.G. CRAN, T.H. van BENEDEN, S.J. DIELEMANN, 1983
Structural changes in bovine oocytes during final maturation in vivo
Gamete Res. 8, 29-47

KUZAN, F.B., R.W. WRIGHT, 1981
Coculture of bovine embryos with bovine fibroblasts
Theriogenology 15, 115

LAMBERT R.D., M.A. SIRARD, C. BERNARD, R. BETAUD, J.E. RIOUX, P.
LEDERE, D.P. MENARD, M. BEDOYA, 1986
In vitro fertilization of bovine oocytes matured in vivo and
collected at laparoscopy
Theriogenology, 25, 117-133

LAWSON, R.A.S., C.E. ADAMS, L.E.A. ROWSON, 1972
The development of sheep eggs in the rabbit oviduct and their viability
after re-transfer to ewes
J. Reprod. Fert. 29, 105-116

LEHN-JENSEN, H., T. GREVE, 1981
Survival of cow blastocysts utilizing short freezing curves
Nord. Vetmed. 33, 523-529

LEIBFRIED, M.L., N.L. FIRST, 1979 a
Effects of divalent cations on in vitro maturation of bovine oocytes
J. exp. Zool. 210, 575-580

LEIBFRIED, M.L., N.L. FIRST, 1979 b
Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to
mature in vitro
J. Anim. Sci. 48, 76-86

LEIBFRIED, M.L., N.L. FIRST, 1980
Follicular control of meiosis in the porcine oocyte
Biol. Reprod. 23, 705-709

LEIBFRIED, M.L., B.D. BAVISTER, 1981
The effects of taurine and hypotaurine on in vitro fertilization in the
golden hamster
Gamete Res. 4, 57-63

LEIBFRIED, M.L., B.D. BAVISTER, 1982

Effects of epinephrine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster

J. Reprod. Fert. 66, 87-93

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., E.S. CRITSER; W.H. EYESTONE, D.L. NORTHEY, N.L. FIRST, 1986

Developmental potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo
Theriogenology, 25, 164

LEIPOLD, W., 1982

Congenital defects of current concern and interest in cattle

The Bovine Practitioner 17, 101-114

LENZ, R.W., G.D. BALL, M.L. LEIBFRIED, R.L. AX, N.L. FIRST, 1983 a

In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes

Biol. Reprod. 29, 173-179

LENZ, R.W., G.D. BALL, J.K. LOHSE, N.L. FIRST, R.L. AX, 1983 b

Chondroitin sulfate facilitates an acrosome reaction in bovine spermatozoa as evidenced by light microscopy, electron microscopy and in vitro fertilization

Biol. Reprod. 28, 683-690

LIEBERMAN, W.E., A. TSAFIRI, S. BAUMINGER, W.P. COLLINGS, K. AHREN, H.R. LINDNER, 1976

Oocyte meiosis in cultured rat follicles during inhibition of steroidogenesis

Acta endocr. 83, 151-157

LOSKUTOFF, N.M., B.R. COREN, D.R. BARRIOS, E. BESSONDO, M.J. BOWEN, G. SONE, D.C. KRAEMER, 1986

Gene microinjection in bovine embryos facilitated by centrifugation
Theriogenology, 25, 168

MAGNUSSON, C., 1980

Role of cumulus cells for rat oocyte maturation and metabolism
Gamete Res. 3, 133-140

MAGNUSSON, C., T. HILLENSJÖ, 1977

Inhibition of maturation and metabolism in rat oocytes by cyclic AMP
J. exp. Zool. 201, 139

MAIJALA, K., 1970

Need and methods of gene conservation in animal breeding
Ann. Gen. Sel. Anim. 2, 403-415

MARKERT, C.L., 1984

Genetic manipulation of mammalian embryos: Current techniques and their potential usefulness in livestock improvement
Proc. Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., Illinois

MARUSKA, D.V., M.L. LEIBFRIED, N.L. FIRST, 1984

Role of calcium and the calcium-calmodulin complex in resumption of meiosis, cumulus expansion, viability and hyaluronidase sensitivity of bovine oocytes
Biol. Reprod. 31, 1-6

MASSEY, J.M., J.G. ANDERSON, W.C. ELLIS, A.M. SORENSEN, D.C. KRAEMER, 1982

Development of bovine embryos following enzymatic removal of the zona pellucida
Theriogenology 17, 99

MAURER, R., J.R. CHENAULT, 1983

Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle
J. Anim. Sci. 56, 1186-1189

MC GAUGHEY, R.W., J. VAN BLERKOM, 1977

Patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes during maturation in vitro
Developm. Biol. 56, 241-254

MC GRATH, J., D. SOLTER, 1983

Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion

Science 22, 1300-1302

MC GRATH, J., D. SOLTER, 1984

Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes

Cell 37, 179-183

MC NATTY, K.P., 1978

Follicular fluid

In: The Vertebrate Ovary, ed. R.E. Jones, New York: Plenum Press, 215-259

MEINECKE, B., 1977

Untersuchungen zur in vitro und in vivo Befruchtung extrakorporal gereifter Eizellen vom Schwein

Z. Tierz. ZüchtBiol. 94, 198-208

MEINECKE, B., S. MEINECKE-TILLMANN, 1978

Experimentelle Untersuchungen zur Funktion der Cumuluszellen während der extrakorporalen Eizellreifung beim Schwein

Zbl. VetMed. C. Anat. Histol. Embryol. 7, 58-69

MEINECKE-TILLMANN, S., B. MEINECKE, 1980

Polyspermie beim Rind

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 93, 246-248

MEINECKE B., S. MEINECKE-TILLMANN, C. BLANCO, 1983

Die Befruchtungs- und embryonale Entwicklungskapazität extrakorporal gereifter Oozyten des Schweines

Zuchthygiene 18, 145-156

MICHEL, G., 1977

Kompodium der Embryologie der Haustiere

Stuttgart: Gustav Fischer Verlag

MINHAS, B.S., J.S. CAPEHART; M.J. BOWEN, J.E. WOMACK, J.D. McGRADY

P.G. HARMS, T.E. WAGNER, D.C. KRAEMER, 1985

Visualization of pronuclei in living bovine zygotes

Biol. Reprod. 30, 687-691

MOOR, R.M., 1978

Role of steroids in the maturation of ovine oocytes

Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 18, 477-482

MOOR, R.M., A.O. TROUNSON, 1977

Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity

J. Reprod. Fert. 49, 101-109

MOOR, R.M., G.M. WARNES, 1978

Regulation of oocyte maturation in mammals

In: Control of ovulation, ed.: D.B., CRIGHTON et al., Butterworths, London, 159-176

MOOR, R.M., C. POLGE, S.M. WILLADSEN, 1980

Effect of follicular steroids on the maturation and fertilization of mammalian oocytes

J. Embryol. exp. Morph. 56, 319-335

MOOR, R.M., J.P. HESLOP, 1981

Cyclic AMP in mammalian follicle cells and oocytes during maturation

J. exp. Zool. 216, 205-209

MOOR, R.M., J.L. OSBORN, D.G. CRAN, D.E. WALTERS, 1981

Selective effect of gonadotrophins on cell coupling, nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes

J. Embryol. exp. Morph. 61, 347

MOORE SMITH, D., D.Y. TENNEY, 1979

Effect of hypophysectomy on mouse oocyte maturation in vitro

J. Reprod. Fert. 55, 415-422

MOORE SMITH, D., D.Y. TENNEY, 1980

Effects of steroids on mouse oocyte maturation in vitro

J. Reprod. Fert. 60, 331-338

MOTLIK, J., H.H. KOEFFOED-JOHNSEN, J. FULKA, 1978

Breakdown of the germinal vesicle in bovine oocytes cultivated in vitro

J. exp. Zool. 205, 377-384

MOTLIK, J., V. KOPECNY, J. PIVKO, J. FULKA, 1980

Distribution of proteins labelled during meiotic maturation in rabbit and pig eggs at fertilization

J. Reprod. Fert. 58, 415-419

NANCARROW, C.D., J.D. MURRAY, M.P. BOLAND, I.G. HAZLETON, R. SUTTON, 1984

Towards gene transfer into ruminant embryos: Effect of centrifugation
Theriogenology 21, 248

NEWCOMB, R., W.B. CHRISTIE, L.E.A. ROWSON, 1978

Birth of calves after in vivo fertilization of oocytes removed from follicles and matured in vitro

Vet. Rec. 102, 461-462

NIWA, K., M.C. CHANG, 1975

Fertilization of rat eggs in vitro at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes

J. Reprod. Fert. 43, 435-451

OSBORN, J.C., R.M. MOOR, 1982

Cell interactions and actin synthesis in mammalian oocytes

J. exp. Zool. 220, 125-129

OSBORN, J.C., R.M. MOOR, 1983

Time-dependent effects of a-amantinin on nuclear maturation and protein synthesis in mammalian oocytes

J. Embryol. exp. Morph. 73, 317-338

PARRISH, J.J., J.L. SUSKO-PARRISH, N.L. FIRST, 1985

In vitro fertilization of bovine oocytes using heparin treated and swimup separated frozen thawed bovine semen is repeatable and results in high frequencies of fertilization

Theriogenology 23, 216

PARRISH, J.J., J.L. SUSKO-PARRISH, M.L. LEIFRIED-RUTLEDGE, E.S.

CRITSER, W.H. EYESTONE, N.L. FIRST, 1986

Bovine in-vitro fertilization with frozen-thawed semen

Theriogenology, 25, 591-599

PINCUS, G., E.V. ENZMANN, 1935

The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro
J. exp. Med. 62, 665-675

PETERS, H., 1978

Folliculogenesis in mammals

In: The Vertebrate Ovary ed. R.E. Jones, New York: Plenum Press,
121-144

PETERS, H., 1979

Some aspects of early follicular development

In: Ovarian Follicular Development and Function ed. A.R. Midgley
W.A. Sadler, New York: Raven Press, 1-13

POWERS, R.D., G.A. PALEOS, 1982

Combined effects of calcium and dibutyryl cyclic AMP on germinal
vesicle breakdown in the mouse oocyte

J. Reprod. Fert. 66, 1-8

QUIRKE, J.F., I. GORDON, 1971

Culture and fertilization of sheep ovarian oocytes

J. agric. Sci. 76, 369-382

RENARD, J.P., 1984

Methods of conserving gametes and embryos of farm mammals

Livest. Prod. Sci. 11, 49-59

RICHARDS, J.S., 1978

Hormonal control of follicular growth and maturation in mammals

In: The Vertebrate Ovary ed. R.E. Jones, New York: Plenum Press, .
331-360

RICHARDS, J.S., A.R. MIDGLEY jr., 1976

Protein hormone action: A key to understanding ovarian follicular
and luteal cell development

Biol. Reprod. 14, 82-94

RICHTER, J.D., R.W. MC GAUGHEY, 1979

Specificity of inhibition by steroids of porcine oocyte maturation
in vitro

J. exp. Zool. 209, 81-90

ROBL, J.M., N.L. FIRST, 1985

Transfer of nuclei from light-cell to two-cell murine embryos
Theriogenology 23, 222

ROBL, J.M., R. PRATHER, W. EYESTONE, F. BARNES, D. NORTHEY,
B. GILLIGAN, N.L. FIRST, 1986

Nuclear transplantation in bovine embryos
Theriogenology, 25, 189

ROCHE, J.F., M.P. BOLAND, T.A. Mc GEADY, 1981

Reproductive wastage following artificial insemination of heifers
Vet. Rec. 109, 401-409

ROSCHLAU, K., H. SCHWIDERSKI, P. KAUFFOLD, P. ROMMEL, F. REHBOCK,
1983

Geschlechtsdiagnose an präimplantiven Embryonen als Teilverfahren
der "Eitransplantation"

Arch. Tierz. 26, 209-216

ROWSON, L.E.A., D.F. DOWLING, 1949

An apparatus for the extraction of fertilized eggs from living cows
Vet. Rec. 61, 191

SANBUISSHO, A., W.R. THRELFALL, 1985

The effects of estrous cow serum on the maturation and fertilization
of the bovine follicular oocyte in vitro

Theriogenology 23, 226

SATO, E., A. IRITANI, Y. NISHIKAWA, 1977

Effects of energy sources on oocyte maturation in pig and cattle
Jap. J. zootech. Sci. 48, 333-335

SCHILLING; E., 1970

Sedimentation as an approach to the problem of separating x- and
y-chromosome-bearing spermatozoa

In: "Sex Ratio at Birth - Prospects for Control", 1970 Symposium
Amer. Soc. Anim. Sci.

SCHILLING, E., D. THORMÄHLEN, 1975

Versuche zur Trennung von X und Y Spermien aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit

Zuchthyg. 10, 118-190

SCHILLING, E., D. THORMÄHLEN, 1976

Dichtegradientenzentrifugation von Kaninchenspermien und das Geschlechtsverhältnis bei den Nachkommen

Zuchthyg. 11, 113-121

SCHILLING, E., H. DOEPKE, 1978

A rapid diagnostic test for the viability of early cattle and rabbit embryos using diacetyl-fluorescein

Naturwissenschaften 65, 658-659

SCHILLING, E., H. NIEMANN, S.P. CHENG, H.H. DOEPKE, 1979

DAPI - a further fluorescence test for diagnosing the viability of early cow and rabbit embryos

Zuchthygiene 14, 170-172

SCHULTZ, R.M., P.M. WASSARMAN, 1977

Specific changes in the pattern of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro

Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 538-541

SCHWEIGERT, F.J., A. LUTTERBACH, W.A. RAMBECK, H. ZUCKER, 1986

Vitamin A- and β -carotene concentrations in bovine follicular fluid in relationship to follicle size

J. Vet. Med. A, 33, 360-364

SEIDEL, G.E. Jr., 1983

Mammalian oocytes and preimplantation embryos as methodological components

Biol. Reprod. 28, 36-49

SEIDEL, G.E. Jr., 1984

Applications of embryo transfer and related technologies to cattle

J. Dairy Sci. 67, 2786-2796

SHALGI, R., N. DEKEL, P.F. KRAICER, 1979

The effect of LH on the fertilizability and developmental capacity of rat oocytes matured in vitro

J. Reprod. Fert. 55, 429-435

SHEA, B.F., J.P.A. LATOUR, K.N. BEDIRIAN, R.D. BAKER, 1976

Maturation in vitro and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes

J. Anim. Sci. 43, 809-815

SIRARD, M.A., R.D. LAMBERT, 1985

In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy

Biol. Reprod. 33, 487-494

SPRINGMANN, K., G. BREM, 1986

Zur Überlebensrate von zentrifugierten und injizierten Schweinezygoten
Zuchthygiene 21, 180

SPRINGMANN, K., F. Graf, G. Brem, H. KÄUBLICH, 1986

Embryo bank for preservation of genetic resources

In: Proc. 3rd World Congr. Gen. Appl. Livest.

Prod., 16.-22.7.86, Lincoln, Nebraska

SREENAN, J. 1970

In vitro maturation and attempted fertilization of cattle follicular oocytes

J. agric. Sci. Camb. 75, 393-396

STAIGMILLER, R.B., R.M. MOOR, 1984

Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle

Gamete Res. 9, 221-229

STEPTOE, P.C., R.G. EDWARDS, 1978

Birth after the reimplantation of a human embryo

Lancet 2, 366

STOCKER, H., G. STRANZINGER, 1981

H-Y Antigen: Genetische Aspekte und Nachweismethoden

Zuchthygiene 16, 1-10

STRAUSS, J.F., L.A. SCHULER, M.F. ROSENBLUM, T. TANAKA, 1981

Cholesterol metabolism by ovarian tissue

Adv. Lipid Res. 18, 99-157

SUMMERS, P.M., J.N. SHELTON, K. BELL, 1983

Synthesis of primary *bos taurus* - *bos indicus* chimeric calves

Anim. Reprod. Sci. 6, 91-102

SÜSS, U., K. WÜTHRICH, 1985

Stages of the first meiotic division observed in bovine oocytes
matured in vitro

Therogenology 23, 231

THIBAULT, C., 1977

Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes

J. Reprod. Fert. 51, 1-15

THIBAULT, C., U. GERARD, Y. MENEZO, 1975

Acquisition par l'ovocyte de lapine et de veau du facteur de
decondensation du noyau du spermatozoïde fécondant (MPGF)

Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys. 15, 705-715

TOYODA, Y., M.C. CHANG, 1974

Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and
the development of eggs following transfer

J. Reprod. Fert. 31, 9-32

TROUNSON, A.O., S.M. WILLADSEN, L.E.A. ROWSON, 1977

Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes
matured in vitro and in vivo and transferred to the oviducts of rabbits

J. Reprod. Fert. 51, 321-327

TROUNSON, A.O., L.R. MOHR, C. WOOD, J.F. LEETON, 1982

Effect of delayed insemination on in vitro fertilization
culture and transfer of human embryos

J. Reprod. Fert. 64, 285-294

TSAFIRI, A., 1978

Oocyte maturation in mammals

In: The Vertebrate Ovary ed. R.E. Jones New York: Plenum Press
409-442

TSAFIRI, A., H.R. LINDNER, U. ZOR, S.A. LAMPRECHT, 1972

In vitro induction of meiotic division in follicle enclosed rat oocytes
by LH, cyclic AMP and prostaglandin E

J. Reprod. Fert. 31, 39-50 2

USUI, N., R. YAMAGIMACHI, 1976

Behavior of hamster sperm nuclei incorporated into eggs at various
stages of maturation fertilization and early development

J. Ultrastruct. Res. 57, 276-288

VAN BLERKOM, J., R.W. MC GAUGHEY, 1978

Molecular differentiation of the rabbit ovum

Developm. Biol. 63, 151-164

VOGEL, F., 1985

Vorkerndarstellung bei Schweinezygoten

München: Diss. med. vet.

WALL, R.J., V.G. PURSEL, R.E. HAMMER, R.L. BRINSTER, 1985

Development of porcine ova that were centrifuged to permit
visualization of pronuclei and nuclei

Biol. Reprod. 32, 645-651

WARNES G.M., R.M. MOOR, M.H. JOHNSON, 1977

Changes in protein synthesis during maturation of sheep oocytes in
vivo and in vitro

J. Reprod. Fert. 49, 331-335

WARWICK, B.L., R.O. Berry, 1949

Inter-generic and intra-specific embryo transfers in sheep and goats

J. Hered. 40, 297-303

WHITTEN, W.K., 1956

Culture of tubal mouse ova

Nature 176, 96

WHITTEN, W.K., 1970

Nutrient Requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro

Adv. Biosci. 6, 129-141

WHITTINGHAM, D.G., 1968

Fertilization of mouse eggs in vitro

Nature 220, 592-593

WHITTINGHAM, D.G., 1977

Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse

o

oocytes previously stored at -196 C

J. Reprod. Fert. 49, 89-94

WHITTINGHAM, D.G., 1980

Parthenogenesis in mammals

Oxford Reviews of Reproductive Biology 2, 205-232

WILLADSEN, S.M., 1981

Embryo transplantation in sheep

In: Management and Diseases of sheep, ed. British Council, Commonwealth Agricultural Bureaux

WILLADSEN, S.M., 1986

Nuclear transplantation in sheep embryos

Nature 320, 63-65

WILLADSEN, S.M., H. LEHN-JENSEN, C.B. FEHILLY, R. NEWCOMB, 1981

The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos

Theriogenology 15, 23-29

WILLADSEN, S.M., C. POLGE, 1981

Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation

Vet. Rec. 108, 211-213

WILLETT, E.L., W.G. BLACK, L.E. CASIDA, W.H. STONE, P.J. BUCHNER, 1951

Successful transplantation of a fertilized bovine ovum

Science 113, 247

WILLIAMS, T.J., 1986

A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the x-linked enzyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase
Theriogenology 25, 733-739

WOLF, G. 1984

Multiple functions of vitamin A
Physiol. Rev. 64, 873-937

WRIGHT, R.W., G.B. ANDERSON, P.T. CUPPS, M. DROST, 1976

Successful culture in vitro of bovine embryos to the blastocyst stage
Biol. Reprod. 14, 157-162

WRIGHT, R.W., K.R. BONDIOLI, 1981

Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animals
J. Anim. Sci. 53, 702-729

XU, K.P., T. GREVE, S. SMITH, P. LIEHMANN, H. CALLESEN, P. HYTTTEL, 1986

Parthenogenetic activation of cattle oocytes matured in vitro and cultured in rabbit oviducts
Theriogenology, 25, 218

ZIEGLER, M., 1984

Beziehungen zwischen Sperma- und Fruchtbarkeitsmerkmalen bei Besamungsbullen an der Besamungsstation der Firma Meggle, Reitmehring-Rottmoos
München: Diss. med. vet.

ZEILMAKER, G.H., W.C. HULSMANN, F. WENSINCK, C. VERHAMME, 1972

Oxygen-triggered mouse oocyte maturation in vitro and lactate utilization by mouse oocytes and zygotes
J. Reprod. Fert. 29, 151-152

ZEILMAKER, G.H., C.M.P.M. VERHAMME, 1974

Observations on rat oocyte maturation in vitro: Morphology and energy requirements
Biol. Reprod. 11, 145-152

10. VERZEICHNIS MEHRFACH VERWENDETER ABKÜRZUNGEN

IVF	= In Vitro Fertilization
TG-N ₂ -Sperma	= In flüssigem Stickstoff tiefgefrorenes Sperma
FSH	= Follikelstimulierendes Hormon
LH	= Luteinisierendes Hormon
PBS	= Phosphate Buffered Saline
TCM 199	= Tissue Culture Medium 199
FCS	= Fetal Calf Serum
BSA	= Bovine Serum Albumine
TL-Medium	= Tyrode Lactate Medium
TALP-Medium	= Tyrode Albumine Lactate Pyruvate Medium
T ₂₋₈	= Teilung in 2-8 Blastomeren
PMSG	= Pregnant Mares Serum Gonadotropin
c-AMP	= Cyklisches Adenosinmonophosphat
KBR-Medium	= Krebs-Ringer-Medium
DAPI	= 4',6'-Diamidino-2-phenylindol
BSS	= Balanced Salt Solution
RIA	= Radio Immuno Assay
MPGF	= Male Pronuclear Growth Factor
HIS	= High Ionic Strength
M II	= Metaphase II der Meiose

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. H. Kräußlich möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte großzügige Unterstützung danken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr.habil. G. Brem danke ich für die Betreuung der Arbeit.

Meinen Studienkollegen, Dr. Florian Schweigert und Dr. Robert Koll, möchte ich für die durchgeführten Analysen, die wertvollen Hinweise und die gute Zusammenarbeit danken.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Beate Rengel, Frau Tamara Holy und Frau Ingrid Großmann für ihre große Hilfsbereitschaft bedanken.

Ferner gilt mein Dank den Mitarbeitern des Lehr- und Versuchsguts Oberschleißheim für die Unterstützung bei der Durchführung der in vivo Kulturtermine und Herrn Stanglmeier für seine Hilfe bei der Auswertung.

Acknowledgement

I am grateful to Drs. Elizabeth S. Critser, Lorraine M. Leibfried-Rutledge and Neil L. First for the time I could spend at their laboratory in the Department of Meat and Animal Science, University of Wisconsin. The information I gained there was of tremendous help for my work.

I would also like to thank Dr. Steen M. Willadsen for his instructions on in vivo culture techniques.

LEBENS LAUF

Angela Maria Lutterbach

geb. Weigl, am 23. Oktober 1958
in Bad Tölz

Eltern

Karl Weigl, Sozialpädagoge
Herta Weigl, geb. Moll

Schulbildung

1965 - 1969 Volksschule Bad Tölz
1969 - 1978 Gymnasium Bad Tölz
Abitur 29. Juni 1978

Studium

1978 - 1983 Studium der Veterinär-
medizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München
Staatsexamen Oktober 1983
Approbation 19. Dezember 1983

Berufstätigkeit

seit Januar 1984 vollbeschäftigte
wissenschaftliche Hilfskraft am
Institut für Tierzucht der Tier-
ärztlichen Fakultät

